

**Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der
Universität Tübingen**

Abteilung für Molekulare Pathologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Kandolf

**Therapie der chronischen Hepatitis B Virus Infektion:
Geno- und phänotypische Analyse der Selektion von
Resistenzmutationen unter antiviraler Therapie mit
Nukleos/tidanaloga**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Christine Walker
aus
Filderstadt**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C.-Th. Bock

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

Gewidmet meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Hepatitis B Virus.....	1
1.1.1 Überblick.....	1
1.1.2 Molekularbiologie des Hepatitis B Virus.....	2
1.1.2.1 Virusaufbau.....	2
1.1.2.2 HBV-Genom und Transkripte	4
1.1.2.3 HBV-Proteine.....	5
1.1.3 Replikationszyklus des Hepatitis B Virus.....	8
1.1.4 HBV-Genotypen.....	10
1.1.5 Immunpathogenese und Virusabwehr.....	11
1.2 Der klinische Verlauf einer HBV-Infektion	13
1.2.1 Die akute HBV-Infektion.....	14
1.2.2 Die chronische HBV-Infektion.....	14
1.3 Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion.....	17
1.3.1 Interferon- α , PEG-Interferon- α 2.....	18
1.3.2 Nukleos/tidanaloga.....	19
1.3.2.1 Definition von Therapieresistenz	20
1.3.2.2 Selektion von Resistenzmutationen gegenüber Nukleos/tidanaloga.....	20
1.3.2.3 Therapie mit Nukleos/tidanaloga und klinische Relevanz der HBV-Polymerasegenmutationen.....	23
1.3.2.4 Weitere relevante Mutationen im HBV-Genom.....	26
1.3.3 Adefovir dipivoxil, Handelsname HEPSERA®.....	27
1.3.3.1 Therapie mit Adefovir dipivoxil.....	28
1.3.3.2 Analyse der Selektion von Resistenzmutationen.....	30

1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	32
2 MATERIAL UND METHODEN.....	33
2.1 Lösungen, Puffer.....	33
2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	33
2.1.2 Lösungen für die Zellkultur.....	34
2.1.3 Puffer und Lösungen für Bakterienzucht.....	34
2.2 Kommerzielle Kits.....	35
2.3 Enzyme.....	35
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.5 Geräte und Zubehör.....	36
2.6 Oligonukleotide.....	37
2.7 Identifizierung und Analyse von Mutationen im HBV- Polymerasegen	38
2.7.1 Studiendesign und Datenerhebung.....	38
2.7.2 Statistische Auswertung.....	39
2.8 Phänotypische Assays.....	40
2.8.1 Generierung einzelner Konstrukte durch gerichtete Mutagenese und Klonierung von Genregionen.....	41
2.8.1.1 Vektoren und Plasmide.....	42
2.8.1.2 Ligation.....	43
2.8.1.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	43
2.8.1.4 Elektrotransformation.....	44
2.8.1.5 Plasmid-DNA-Präparation.....	44
2.8.1.6 Restriktionsverdau.....	45
2.8.1.7 Sequenzierung.....	46

2.8.1.8 Agarose-Gelelektrophorese Experimente.....	46
2.8.1.9 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel.....	47
2.8.2 Zellkultur.....	47
2.8.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen.....	47
2.8.2.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	48
2.8.2.3 Kultivierung der Zellen unter Einfluß des Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil.....	48
2.8.2.4 Zellernte.....	49
2.8.2.5 Isolation der Virus-Kapside.....	49
2.8.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	53
2.8.2.7 Nested-PCR	53
2.8.2.8 Quantitative PCR.....	54
2.8.2.9 RNA-Isolation.....	55
2.8.2.10 One-Step Reverse Transkriptase (RT-) -PCR	55
3 ERGEBNISSE.....	57
3.1 Genotypische Analyse der Selektion von Resistenzmutationen.....	57
3.1.1 Angaben zu den anonymisierten Patientendaten.....	58
3.1.2 Analyse der HBV-Genotypverteilung	63
3.1.3 Genotypische Analyse der HBV-reverse Transkriptase-Domäne von Patienten mit Therapieversagen unter ADV-Therapie.....	65
3.1.4 Analyse der Korrelation der Polymerasegenmutationen mit ADV- Therapieresistenz	68
3.2 Funktionelle phänotypische Analysen der Selektion von Resistenzmutationen.....	73
3.2.1 Generierung von replikationskompetenten HBV-Plasmiden mit Polymerasemutationen.....	74
3.2.2 Bestimmung der Replikationskompetenz der neu generierten HBV- Konstrukte.....	76

3.2.2.1 Bestimmung der Replikationskompetenz der HBV-Plasmide im DNA-Nachweis.....	76
3.2.2.2 Bestimmung der Replikationskompetenz der HBV-Plasmide im RNA-Nachweis.....	76
3.2.3 In vitro Analyse der Sensitivität von HBV-Polymerasemutationen gegenüber Adefovir dipivoxil.....	77
3.2.3.1 Replikationskompetenz der HBV Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil.....	78
3.2.3.2 Replikationskompetenz der Resistenzmutation rtN236T unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil.....	79
3.2.3.3 Replikationskompetenz der Polymerasemutation rtN248H unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil.....	81
4 DISKUSSION.....	83
4.1 Einfluss der Vorbehandlung mit IFN-α und Lamivudin auf die Resistenzentwicklung gegenüber Adefovir dipivoxil.....	84
4.2 Vermehrtes Auftreten HBeAg-positiver Infektionen.....	86
4.3 Einfluss der zugrunde liegenden HBV-Genotypen auf die antivirale Therapie mit Nukleotidanaloga.....	87
4.4 Charakterisierung des Einflusses spezifischer HBV-Polymerasemutationen auf die antivirale Therapie mit Nukleos/tidanaloga.....	89
4.4.1 Selektion von HBV-Mutationen in der HBV-Polymerasegen-Domäne gegenüber Nukleos/tidanaloga.....	89
4.4.2 Einfluss der Resistenzmutation rtN236T auf die Therapie mit Adefovir dipivoxil.....	91

4.4.3 Einfluss weiterer HBV-Polymerasegenmutationen auf die Therapie mit Adefovir dipivoxil.....	93
4.4.4 In vitro Sensitivität der Mutation rtN248H gegenüber einer Behandlung mit Adefovir dipivoxil.....	96
4.5 Ausblick.....	97
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	100

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ADV	Adefovir dipivoxil
ALT	Alaninaminotransferase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BCP	Basal Core Promotor
C	Cystein
cccDNA	covalently closed circle DNA
CD	Cluster of Differentiation
D	Aspartat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DR1/2	Direct Repeat 1/2
EC	Effective Concentration
EDTA	EthylenDiaminTetraAzetat
ENH	Enhancer
H	Histidin
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B early Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HuH-7	Humane Hepatomazelllinie 7
I	Isoleucin
IFN	Interferon
IU	International Unit (Enzymaktivitätseinheit)
kb	Kilobase

kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L	Lysin
M	Methionin
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mut	Mutation
N	Asparagin
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
P	Prolin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEG-IFN	pegyliertes Interferon
pgRNA	prägenomische RNA (HBV)
Q	Glutamin
r	Korrelationskoeffizient
rcDNA	relaxed circular DNA
rpm	rotations per minute
RT	reverse Transkriptase
S	Serin
T	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Valin
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
Y	Thyrosin

1 Einleitung

1.1 Hepatitis B Virus

1.1.1 Überblick

Das Krankheitsbild einer Hepatitis war schon lange vor der Entdeckung des Hepatitis B Virus bekannt. Vor rund 100 Jahren wurden erste Fälle von Serumhepatitiden (der heutigen Hepatitis B Virus-(HBV-)Infektion in Krankenakten aufgeführt. Der Begriff der Hepatitis B Virus Infektion wurde 1947 von MacCallum geprägt (MacCallum, McFarlan et al. 1951) und 1973 von der World Health Organisation (WHO) nach Entdeckung des Virus übernommen. Das erste infektiöse HBV-Virion wurde 1970 aus Patientenseren isoliert, während Blumberg schon 1965 das Oberflächenantigen, das heutige Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) bei einer Hämophilie-Studie nachgewiesen hatte (Blumberg, Alter et al. 1965).

Das Hepatitis B Virus verursacht akute und chronische Leberentzündungen und ist an der Entstehung der Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms (HCC) beteiligt. Die HBV-Infektion zählt zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. Aktuellen Schätzungen zufolge sind derzeit zwei Milliarden Menschen infiziert, wobei etwa 400 Millionen chronische Virusträger sind (WHO 2007). An den Krankheitsfolgen einer HBV-Infektion versterben jährlich weltweit etwa eine Million Menschen.

Die Prävalenz der chronischen HBV-Infektion ist abhängig von der geographischen Lage sehr unterschiedlich. In Europa sind im Nordwesten weniger als 0,1 % der Bevölkerung infiziert, in Ost- bzw. Südeuropa leiden dagegen bis zu 8 % der Bevölkerung an einer chronischen Infektion. In Deutschland beläuft sich die Zahl chronisch Infizierter auf 0,6 % (Robert Koch Institut, 2006). HBV wird über Blut und Blutprodukte übertragen, wobei in Entwicklungsländern die perinatale Infektion den Hauptübertragungsweg

dastellt. In Industrienationen infizieren sich hauptsächlich junge Erwachsene bei intravenösem Drogenmissbrauch und sexueller Exposition.

1.1.2 Molekularbiologie des Hepatitis B Virus

1.1.2.1 Virusaufbau

Die infektiösen HBV-Virionen werden nach ihrem Entdecker „Dane-Partikel“ genannt (Dane, Cameron et al. 1970). Sie haben einen Durchmesser von 42 nm und lassen sich elektronenmikroskopisch darstellen (Abb. 1, (A)). Die „Dane-Partikel“ setzen sich aus der Virushülle, einem ikosaedrischen Viruskapsid und dem Virusgenom zusammen. Die Virushülle leitet sich von der intrazellulären Membran des endoplasmatischen Retikulums ab, in die virale Glykoproteine, die Hepatitis B surface Antigene (HBsAg), eingelagert sind (Abb. 2, (A)). Sie werden entsprechend ihrer Größe in große, mittlere und kleine HBsAg unterteilt, LHBs= large HBsAg, MHBs= middle HBsAg, SHBs= small HBsAg (Kap. 1.1.2.3). Das Kapsid besteht aus Kapsid-(Core-)Protein-Untereinheiten, den sog. Hepatitis B core Antigenen (HBcAg) und umschließt das Virusgenom mit der kovalent gebundenen HBV-Polymerase. Zusätzlich zu den Virionen sezernieren die infizierten Hepatozyten überschüssig produziertes HBsAg in Form von globulären (20 nm) (Abb. 1, Abb. 2 (B)) oder filamentösen (20 nm- 300 nm) Partikeln (Abb. 1, Abb. 2 (C)), welche keine DNA enthalten und nicht infektiös sind (Lee 1997).

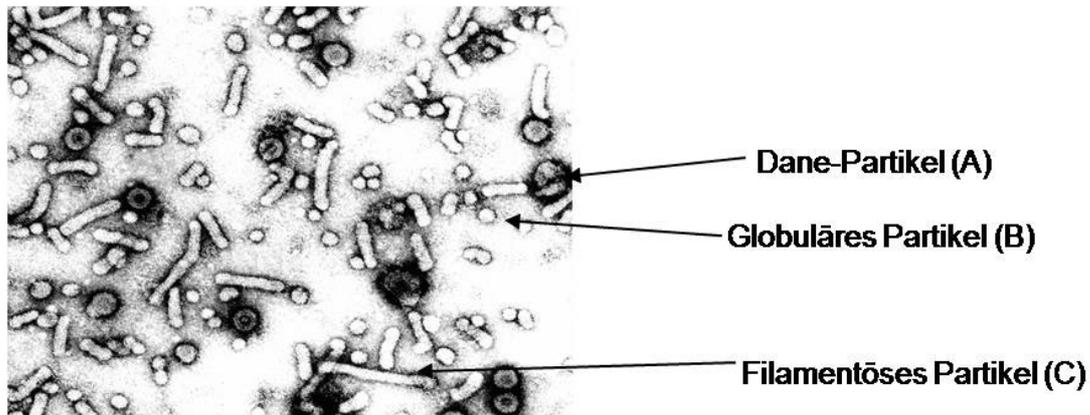


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBV-Partikeln, isoliert aus Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten: Dane-Partikel (A), globuläre Partikel (B) und filamentöse Partikel (C) (Bock, Schranz et al. 1994) (Bock und Zentgraf, 1992).

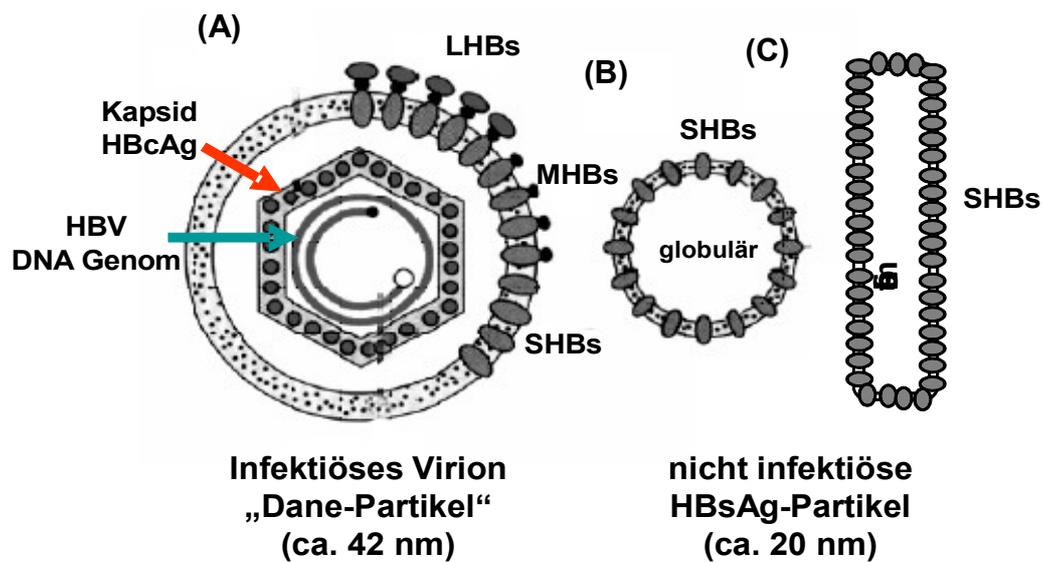


Abb. 2: (A) Schematische Darstellung eines infektiösen „Dane-Partikels“, bestehend aus einer Virushülle mit eingelagerten Oberflächenproteinen (LHBs=large HBs, MHBs=middle HBs, SHBs=small HBs), Viruskapsid und partiell doppelsträngigem HBV-DNA Genom, (B) globuläres Partikel, (C) filamentöses Partikel (in Anlehnung an (Bock CT., 2006))

1.1.2.2 HBV-Genom und Transkripte

Das Hepatitis B Virus Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen DNA mit ungefähr 3,2 kbp Länge, wobei der Minusstrang vollständig, der Plusstrang jedoch unvollständig ist. Dieser bricht während der Synthese am 3'-Ende ab und besteht variabel aus 40-85 % des HBV-Genoms (Landers, Greenberg et al. 1977). Das Genom liegt im Virion als relaxiert zirkuläre (rc) DNA vor. Am 5'-Ende sowohl des Plus- als auch des Minusstrangs finden sich direkte Wiederholungssequenzen (Direct Repeats, DR1 und DR2) mit einer Länge von 11 Basenpaaren, welche als Cis-Elemente eine entscheidende Funktion bei der reversen Transkription haben (Seeger, Ganem et al. 1986). Darüberhinaus ist an das 5'-Ende des Minusstrangs die HBV-Polymerase kovalent gebunden.

Das Genom ist in vier sich überlappende offene Leserahmen (open reading frames (ORF)) organisiert, der Polymerase-, der Kapsid-(PräC/Core-)ORF, der Leserahmen für die Oberflächenproteine (PräS1/PräS2/S-ORF) und der X-Protein Leserahmen (Abb. 3). Während der Transkription des HBV werden vier RNA-Transkripte gebildet, mit Längen von 3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb, und 0,7 kb. Reguliert wird die Transkription durch virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren über vier Promotoren und zwei Enhancer-Elemente. Da das Genom eine einzige Polyadenylregion enthält, enden die viralen RNAs in einem gemeinsamen 5'-Ende. Unter Verwendung verschiedener Startkodons innerhalb der ORFs werden sieben, in Kap. 1.1.2.3 genauer beschriebene Proteine translatiert. Weit mehr als die Hälfte der Nukleotide werden in mehr als einem ORF verwendet (Nassal and Schaller 1993).

Das 3,5 kb RNA-Transkript dient als Vorlage für die Translation der HBV-Polymerase, des Coreproteins und des Präcoreproteins. Zudem fungiert es als prägenomische RNA (pgRNA), welche mit einer Überlänge von 1,28fach des HBV-Genoms die Matrize für die reversen Transkription der viralen HBV-DNA darstellt (Kap. 1.1.3). Von den 2,4 und 2,1 kb RNA-Transkripten werden die

großen, mittleren und kleinen Oberflächenproteine translatiert. Die 0,7 kb lange RNA stellt die Vorlage für die Synthese des X-Proteins dar.

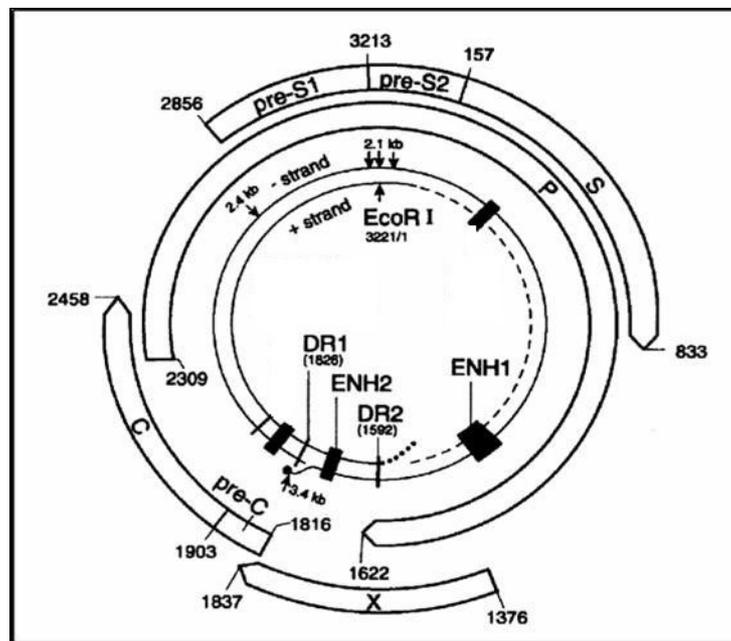


Abb. 3: Darstellung des Plus- und Minusstrangs des HBV-Genoms, des Polymerase-(P-), PräC-/Core-(C-), PräS1-/PräS2-/S-(pre-S1-, preS2-, S-) und X-Leserahmen, jeweils mit Angabe der Nukleotidnummer, ENH1 und ENH2 (Enhancer), DR1 und DR2 (Direct Repeats), *EcoRI*, Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI*.

1.1.2.3 HBV-Proteine

Unter Verwendung verschiedener Startkodons innerhalb der vier ORFs werden sieben HBV-Proteine translatiert. Das HBV-Polymeraseprotein besteht je nach Genotyp aus 843 bis 845 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 90 kDa. Es wird in vier funktionelle Bereiche unterteilt: Das terminale Protein, die Spacer Region, die reverse Transkriptase und die RNaseH (Abb. 4). Das N-terminal gelegene terminale Protein (Aminosäure 1 bis 179) initiiert als Proteinprimer die reverse Transkription (Kap. 1.1.3) und vermittelt die Enkapsidierung des Genoms sowie die Bindung der viralen Polymerase an das 5'-Ende des HBV-Minusstrangs (Bartenschlager, Junker-Niepmann et al. 1990).

Die Spacer Region (AS 180 bis 348) besitzt keine enzymatische Aktivität und ihre biologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Die reverse Transkriptase beinhaltet als Kernstück des HBV-Polymeraseproteins sieben hochkonservierte Domänen (A bis G). Eigens für die Aminosäuren der reversen Transkriptase wurde eine generelle Nomenklatur festgelegt, welche dem Konsens des HEP DART Internationalen Komitees entspricht (Stuyver, Locarnini et al. 2001), wobei die Aminosäuren von 1 bis 344 durchgezählt werden. Die reverse Transkriptase fungiert bei der Synthese des Minusstrangs als RNA-abhängige DNA-Polymerase, bei der Elongation des Plusstrangs als DNA-abhängige DNA-Polymerase. Das hochkonservierte katalytische Zentrum der reversen Transkriptase mit dem YMDD-Motiv (Tyrosin, Methionin, Aspartat, Aspartat) des Enzyms befindet sich in der C-Domäne (Ferir, Kaptein et al. 2008). Teilt man in Anlehnung an den Aufbau der reversen Transkriptase des HI-Virus und des Murinen Leukämievirus (Das, Xiong et al. 2001) die HBV reverse Transkriptase in die funktionellen Domänen genannt- „Finger“, „Daumen“ und „Handfläche“ und konstruiert daraus eine dreidimensionale Darstellung, ergibt sich eine rechte-Hand-Struktur (Abb. 5). Am C-terminalen Ende des Polymeraseproteins befindet sich mit 153 AS der Bereich der RNaseH, die während der reversen Transkription die RNA-Matrize abbaut.

Das HBV-Präcoreprotein wird wie das HBV-Coreprotein durch den PräCore/Core-ORF kodiert. Das Präcoreprotein enthält zusätzlich zum Coreprotein eine aus 19 Aminosäuren bestehende Lokalisationssequenz für das endoplasmatische Retikulum, wo es modifiziert und anschließend als sogenanntes Hepatitis B early Antigen (HBeAg) in der Frühphase der akuten Infektion freigesetzt wird (Standring, Ou et al. 1988). Es dient als serologischer Marker der akuten Infektion, wobei eine Funktion bei der Etablierung der Viruspersistenz vermutet wird (Milich, Schodel et al. 1995). Das HBV-Coreprotein, auch Hepatitis B core Antigen (HBcAg) bildet nach einem Selbstassemblierungsprozess zu Coreprotein-Untereinheiten das Nukleokapsid,

indem sie sich über intermolekulare Wechselwirkungen aneinander lagern (Nassal and Schaller, 1993).

Der PräS1/PräS2/S-ORF kodiert mit je einem Startkodon für die drei verschiedenen Oberflächenproteine, wobei alle auf Grund nur eines Stoppkodons das gleiche C-terminale Ende besitzen. Die Oberflächenproteine werden nach ihrer Translation in die Membranen des endoplasmatischen Retikulums eingelagert und schnüren sich entweder als Virushülle oder als globuläre und filamentöse Partikel vom endoplasmatischen Retikulum ab (Abb. 1, Abb. 2). Das kleine Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) bildet den Hauptbestandteil der Oberflächenproteine. HBsAg löst im Infektionsverlauf die humorale und zelluläre Immunantwort aus, weswegen rekombinantes HBsAg als Impfantigen des 1982 eingeführten Impfstoffs eingesetzt wird. HBsAg ist im Blut akut und chronisch infizierter Patienten serologisch nachweisbar.

Das X-Protein entsteht aus einem 0,7 kb Transkript. Seine Funktion ist bislang nicht völlig geklärt, es soll aber als Transaktivator wirken und zur HBV induzierten HCC-Entstehung beitragen (Chisari 2000).

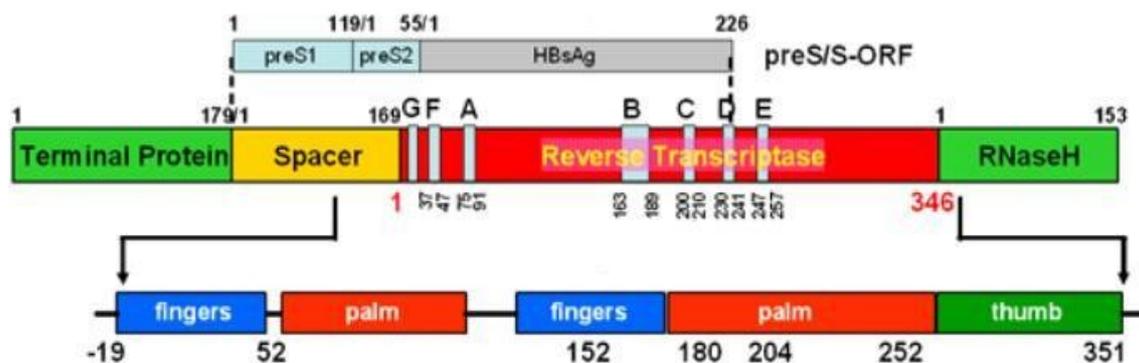


Abb. 4: Darstellung der HBV-Polymerase: terminales Protein, Spacer, reverse Transkriptase (mit den hochkonservierten Domänen A-G) und RNaseH. Die Zahlenwerte zeigen die Aminosäureposition des jeweiligen Abschnitts. Oberhalb der reversen Transkriptase ist der überlappende PreS/S-Leserahmen (ORF), unterhalb sind die Genomabschnitte des 3D-Modells mit Finger, Handfläche und Daumen dargestellt (Abb. 5).

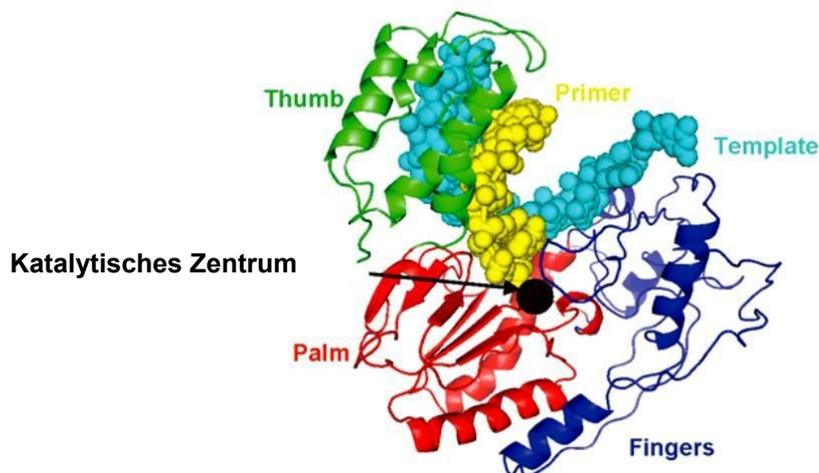


Abb. 5: Die rechte-Hand-Struktur der HBV-Polymerase im 3D-Modell mit katalytischem Zentrum im Innern der Polymerase (Abbildung modifiziert nach Torresi 2006)

1.1.3 Replikationszyklus des Hepatitis B Virus

Der Replikationszyklus des Hepatitis B Virus wird in Abb. 6 dargestellt. Nach der Adsorption der Virionen an die Hepatozyten über eine Wechselwirkung der PräS₂-Domäne des großen HBsAg mit der Hepatozytenoberfläche (1) wird über einen bislang unbekanntem Rezeptor das Virion endozytotisch aufgenommen (2). Das Nukleokapsid gibt das Virusgenom in den Zellkern frei, wobei es selbst im Zytoplasma verbleibt und dort abgebaut wird (3). Im Zellkern wird das nicht kovalente, relaxiert zirkulär vorliegende Genom durch zelluläre Enzyme zur kovalent geschlossenen, zirkulären Form (cccDNA) umgewandelt (4) und liegt anschließend als Nukleosomen-assoziiertes Minichromosom im Zellkern vor (Bock, Schranz et al. 1994; Bock, Schwinn et al. 2001). Die cccDNA spielt eine wichtige Rolle bei der Viruspersistenz und dient der RNA-Polymerase II der Wirtszelle als Vorlage für die Transkription der verschiedenen RNA-Spezies (6) (Kock and Schlicht 1993), von welchen anschließend im Zytoplasma die HBV-Proteine translatiert werden (7). Nach der Translation des Polymeraseproteins und der Coreproteine von der pgRNA wird durch deren Wechselwirkung mit der pgRNA die Enkapsidierung initiiert (8) (Kap. 1.1.2.3). Die Coreproteine werden

durch Wechselwirkungen angeregt sich als Coreprotein-Untereinheiten zum Nukleokapsid zusammenzulagern (9). Anschließend wird im Nukleokapsid die reverse Transkription der pgRNA zur partiell doppelsträngigen DNA durch den so genannten Protein-Priming Komplex gestartet (10a). Dann bindet die Polymerase an eine Stamm-Schleifen-Struktur am 5'-Ende der pgRNA und startet die reverse Transkription. Zuerst wird ein vier Nukleotid- langes Oligomer synthetisiert, das an das 3'-Ende der pgRNA, das Direct Repeat DR1 versetzt wird. Von dort wird der Minusstrang von 3' nach 5' entlang der pgRNA synthetisiert, wobei gleichzeitig zur Synthese die RNA-Vorlage durch die RNaseH der Polymerase bis auf ein kleines RNA-Oligomer abgebaut wird. Dieses RNA-Oligomer dient nach seiner Translokation an das DR2 des Minusstrangs als Primer für die Plusstrang-Synthese (10b). Die Plusstrang-Synthese erfolgt entlang des Minusstrangs und bricht variabel am 3'-Ende ab, wodurch der Plusstrang aus 40-85 % des HBV-Genoms besteht (Landers et al., 1977). Nach der Virusgenomsynthese werden die Kapside entweder über den sekretorischen Weg sezerniert (11a) oder zurück in den Zellkern geschleust, um die für die Transkription erforderliche cccDNA-Menge aufrecht zu erhalten (11b). Auf dem sekretorischen Weg erhalten die Virionen die Virushülle durch Abschnürung von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (Ganem and Varmus 1987) und werden über den Golgi-Apparat aus der Zelle freigesetzt (12).

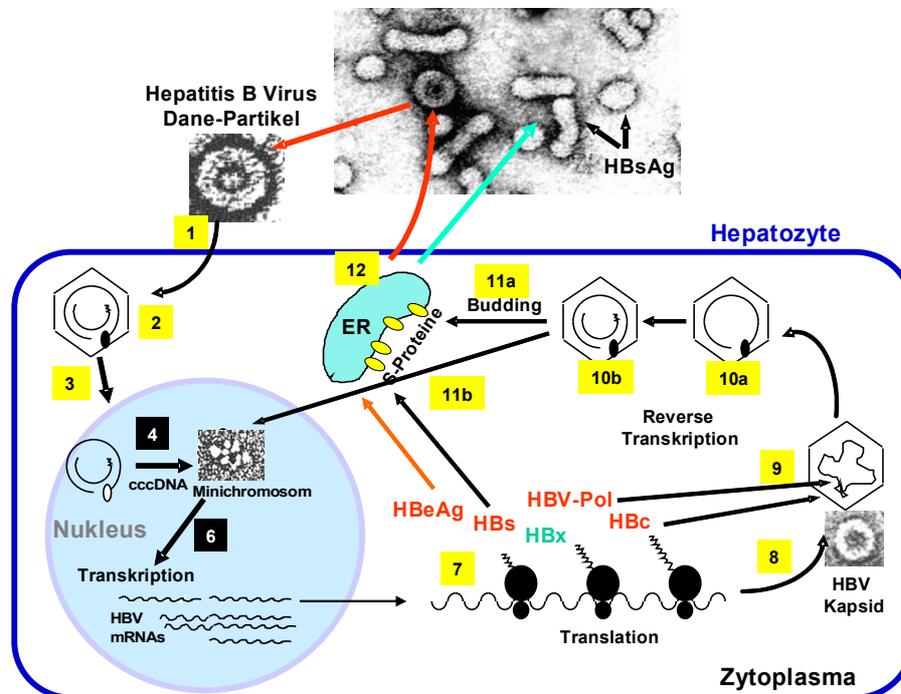


Abb. 6: Schema des Replikationszyklus des Hepatitis B Virus, Beschreibung siehe Text (EM Abbildungen, Bock & Zentgraf 1992; in Anlehnung an Nassal & Schaller (Nassal and Schaller 1996)).

1.1.4 HBV-Genotypen

Es sind acht verschiedene Genotypen (A-H) des HBV bekannt, die sich durch Nukleotiddifferenzen von mehr als 8 % unterscheiden (Stuyver, De Gendt et al. 2000). Die Genotypen lassen sich weiter in acht Subtypen unterteilen, welche wiederum in Sequenzunterschieden von mehr als 4 %, aber weniger als 8 % in der S-Domäne des HBsAg bestehen. Der HBV-Genotyp A ist in den USA und in Nord- und Mitteleuropa am weitesten verbreitet. Der HBV-Genotyp D ist in Südeuropa, im Mittleren Osten und in Indien am häufigsten anzutreffen. Genotyp B und C haben in Asien die höchste Prävalenz, der HBV-Genotyp E wiederum ist begrenzt auf Westafrika, HBV-Genotyp F wird in Zentral- und

Südamerika gefunden. Über die Verteilung der Genotypen G und H ist bisher wenig beschrieben (Liu, Kao et al. 2005).

Die verschiedenen HBV-Genotypen beeinflussen den Krankheitsverlauf und das Ansprechen auf die antivirale Therapie unterschiedlich. Um in Studien eines Genotypvergleichs der geographischen Verteilung gerecht zu werden, sollte der HBV-Genotyp A mit HBV-Genotyp D verglichen werden, ebenso wie der HBV-Genotypen B mit HBV-Genotyp C. Unter IFN-Therapie wurden bei Genotyp A im Vergleich zu D und bei Genotyp B im Vergleich zu C bessere Therapieergebnisse erzielt (Wai, Chu et al. 2002; Erhardt, Blondin et al. 2005). Für Lamivudin wurde bei Genotyp A im Vergleich zu D eine höhere Rate an Resistenzentwicklungen gefunden (Zollner, Petersen et al. 2004). Für Adefovir sind bislang keine genotypabhängigen Unterschiede bekannt (Westland, Delaney et al. 2003; Liu, Kao et al. 2005). Für andere Nukleos(tid)analoga stehen zum aktuellen Zeitpunkt Untersuchungen noch aus.

1.1.5 Immunpathogenese und Virusabwehr

Das Hepatitis B Virus ist streng hepatotroph, wirkt aber selbst nicht zytotoxisch. Daher trägt die Immunantwort des Wirtsorganismus auf die HBV-Infektion entscheidend zur Entstehung der klinischen Symptome einer Hepatitis und deren Folgen, wie einer Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei. Zytotoxische T-Zellen spielen bei der Virusbekämpfung die wichtigste Rolle. Sie erkennen HBV-Epitope viraler Proteine, die infizierte Hepatozyten über MHC-I Moleküle präsentieren, und leiten nach einer Aktivierung der Fas-Liganden durch Zytokine und Perforine die Apoptose der infizierten Zellen ein (Lee, Lim et al. 1997). Zudem sezernieren zytotoxische T-Zellen nach ihrer Aktivierung Interferon-(IFN-) γ und Tumornekrosefaktor-(TNF-) α , wodurch die Virusexpression und Virusreplikation gehemmt wird ohne einen zytotoxischen Effekt hervorzurufen (Chisari 2000). CD4 positive T-Zellen werden durch die Präsentation viraler Antigene durch Makrophagen über MHC-II Moleküle aktiviert, welche über eine Zytokinausschüttung B-Zellen und

weitere T-Zellen mobilisieren. Die Effektivität der Immunantwort gegenüber der HBV-Infektion bestimmt den Verlauf der HBV-Infektion und entscheidet darüber, ob die akute Infektion ausheilt oder chronifiziert. Sie hängt unter anderem von der Affinität der HBV-Epitope zu den MHC-Bindungsstellen ab. Somit führen interindividuelle Unterschiede der MHC-Moleküle ebenso wie das wirtsspezifische T-Zell-Repertoire zu variablen Verläufen der HBV-Infektion (Lee, Lim et al. 1997).

Die Immunantwort während einer akuten selbstlimitierenden Infektion ist sehr stark. Die Virusexpression wird gestoppt, die infizierten Zellen werden durch eine polyklonale T-Zell-Reaktion zerstört, und es werden protektive Antikörper gegen HBsAg gebildet. Eine chronische Infektion ist Folge einer zu schwachen oder unspezifischen Immunantwort, was daran deutlich wird, dass während einer chronischen Infektion kaum zytotoxische Zellen nachweisbar sind. Für die Etablierung einer chronischen Infektion spielen „Immunescape-Mechanismen“ eine wichtige Rolle. Die freigesetzten HBe- und HBs-Antigene wirken als sogenannte „Tolerogene“, indem sie die Bildung von HBcAg spezifischen Antikörpern und die HBcAg spezifische T-Zellreaktion unterdrücken. Sie führen dadurch zu einer Toleranz gegen HBV spezifische Antigene (Chisari 2000). Die Viruspersistenz führt durch eine anhaltende nekroinflammatorische Leberschädigung zu den Folgen der chronischen Infektion wie Leberzirrhose und HCC.

Die maligne Transformation einer chronischen HBV-Infektion ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch ist bei einer chronischen HBV-Infektion das Risiko ein HCC zu entwickeln 100fach erhöht (Beasley, Hwang et al. 1981). Während der Immunreaktion von aktivierten Makrophagen gebildete freie Radikale verursachen oxidative DNA-Schäden im viralen und zellulären Genom und begünstigen die maligne Transformation. Als eine virusspezifische Ursache der Transformation wird in das zelluläre Genom integrierte HBV-DNA angenommen, die in den meisten Tumoren zu finden ist und nachweislich das zelluläre Wachstum beeinflusst. Weiter wirkt das X-Protein als Transaktivator

zellulärer und viraler Promotoren und hemmt das Tumorsuppressorgen p53 (Chisari 2000).

1.2 Der klinische Verlauf einer HBV-Infektion

Der Verlauf einer HBV-Infektion ist sehr variabel (Abb. 7) und wird durch das Alter und den Immunstatus des Patienten entscheidend mitbestimmt. In der Mehrzahl der Fälle verläuft die akute Infektion inapparent, bei ungefähr einem Drittel der Erwachsenen ikterisch und in weniger als 1 % fulminant, was meist tödlich im akuten Leberversagen endet. Der Übergang einer akuten Infektion in eine chronische Infektion wird bei ca. 5 % der Erwachsenen und bei ca. 30 % der Kleinkinder beobachtet. Eine perinatale Infektion chronifiziert in bis zu 90 % der Fälle. Während einer chronischen Infektion sind etwa 70 % der HBV-Infizierten klinisch stumme HBV-Träger, ungefähr 30 % entwickeln eine chronisch aktive Hepatitis, die über einen Zeitraum von 10 Jahren bei etwa 20 % der Patienten zu einer Leberzirrhose führt. 15 % der Patienten entwickeln in weiteren 5 Jahren ein primäres hepatozelluläres Karzinom (HCC) (RKI 2006).

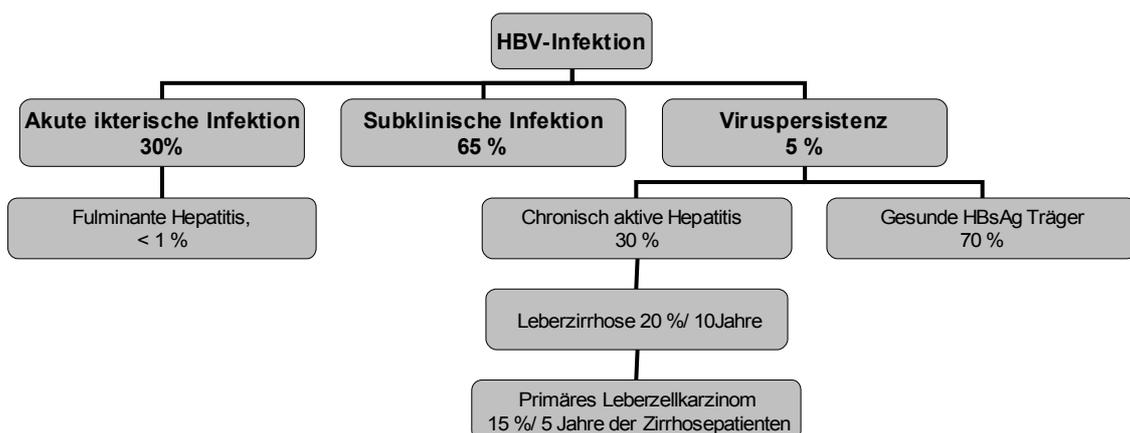


Abb. 7: Verlaufsmöglichkeiten der HBV-Infektion bei gesunden Erwachsenen mit prozentualen Wahrscheinlichkeiten (modifiziert nach Herold, 2007 (Herold 2007))

1.2.1 Die akute HBV-Infektion

Eine akute HBV-Infektion mit einer Inkubationszeit von 30-180 Tagen heilt innerhalb von sechs Monaten aus. Im Prodromalstadium zeichnet sich die Infektion durch grippeähnliche Symptome, gastrointestinale Beschwerden und eventuell rechte Oberbauchschmerzen aus. Nach 4-8 Wochen kommt es zur hepatischen Organmanifestation, die bei etwa 65 % der Erwachsenen anikterisch, bei etwa 30 % ikterisch verläuft (Abb. 7). Die Transaminasen steigen dabei auf Werte zwischen 500 und 3000 IU/l (Normwert 35 IU/l). Die virologisch-serologische Diagnostik der akuten HBV-Infektion umfasst die Detektion von HBsAg, anti-HBc, HBeAg und gegebenenfalls anti-HBe. IgM-Antikörper gegen das Coreprotein, anti-HBc sind immer nachweisbar, während in 10% der Fälle HBsAg nicht nachweisbar ist. In diesem Fall wird statt HBsAg die HBV-DNA bestimmt.

Eine akute Infektion verläuft in der Regel selbstlimitierend und wird bei kompensierter Leberfunktion ausschließlich mit Allgemeinmaßnahmen therapiert, da eine antivirale Therapie weder die Krankheitsdauer noch die Heilungsrate beeinflusst (Kumar, Satapathy et al. 2007). Eine HBsAg-Serokonversion zeigt die Ausheilung an. Patienten mit fulminanter Hepatitis sollten bei ersten Anzeichen einer Einschränkung der Lebersynthese antiviral behandelt und darüber hinaus in einem Transplantationszentrum betreut werden. Diese Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) stützt sich jedoch nur auf Fallberichte, da keine randomisiert kontrollierten Studien vorliegen (Kondili, Osman et al. 2004).

1.2.2 Die chronische HBV-Infektion

Bei etwa 5 % der immunkompetenten Erwachsenen verläuft eine HBV-Infektion chronisch (Abb. 7), was durch eine Viruspersistenz von länger als sechs Monaten definiert wird. Die Diagnostik der chronischen HBV-Infektion umfasst

den Nachweis des bei der chronischen Infektion persistierenden Oberflächenantigens HBsAg, der HBV-DNA, sowie der persistierenden Marker der Virusreplikation, das HBeAg. Für die Bestimmung des Grads der entzündlichen Aktivität (Grading) und des Fibroseausmaßes (Staging) der Leber stellt die Leberbiopsie den Goldstandard dar. Eine spontane Ausheilung wird in 0,5-1 % der Fälle pro Jahr selten beobachtet, kann jedoch durch eine IFN-Therapie auf 10% erhöht werden. Insgesamt werden vier Verlaufsformen unterschieden, die variabel ineinander übergehen können.

Chronisch aktive HBV-Infektion, immunaktive Form:

Von einer chronisch aktiven Infektion wird gesprochen, wenn die Viruslast den Grenzwert von mehr als 10^4 Kopien/ml überschreitet, die Transaminasen über das doppelte der Norm erhöht sind (Normwert: 35 IU/l) und histologisch eine Leberschädigung nachweisbar ist. In fortgeschrittenem Stadium findet sich oft eine Einschränkung der Lebersynthese, was sich an einem fallenden Quick-Wert und niedrigem Albumin und Cholinesterase im Serum zeigt. Somit ist in der immunaktiven Phase virologisch, biochemisch und klinisch eine Infektion nachweisbar. In dieser Phase besteht die Gefahr der Progression zur Leberzirrhose und zum primären HCC (Kap. 1.2, Abb. 7) (Yuen, Yuan et al. 2005). Es finden sich zwei Varianten der immunaktiven Form: Die HBeAg-positive chronisch aktive und die HBeAg-negative chronisch aktive HBV-Infektion.

Als HBeAg-positive chronisch aktive HBV-Infektion wird eine Infektion mit einem „Wildtyp“-Virusstamm bezeichnet, bei der HBsAg und HBeAg gebildet werden. Die Dauer der Phase und die Häufigkeit und Heftigkeit der Schübe korrelieren positiv mit dem Zirrhose- und HCC-Risiko (Yim and Lok 2006).

Bei der HBeAg-negativen chronisch aktiven HBV-Infektion liegt in der Regel eine Core-/Präcore-Mutante vor, welche die Bildung von HBeAg verhindert. Eine HBeAg-negative Infektion zeigt verglichen mit einer HBeAg-positiven Infektion eine nur mäßige Erhöhung der Viruslast auf zwischen 10^4 und 10^8 Kopien/ml und ist durch eine fluktuierende Erhöhung der HBV-DNA und der

Transaminasen gekennzeichnet (Tillmann 2007). Antikörper gegen HBeAg sind meist nachweisbar. Die Patienten erreichen diese Phase nach unterschiedlich langer Zeit aus einem inaktiven HBsAg-Trägerstatus (siehe unten) oder direkt aus der HBeAg-positiven chronisch aktiven Form heraus. Die Prävalenz der HBeAg-negativen HBV-Infektion ist steigend, wofür als Gründe ein gestiegenes Bewusstsein für das Vorhandensein dieser Form, eine sinkende Zahl an Neuinfektionen und das Älterwerden der Patienten angeführt werden können, da die inaktive Form mit steigender Krankheitsdauer vermehrt in eine HBeAg-negative Infektion übergeht (Yim and Lok 2006). Eine Infektion mit einer Core-/Präcore-Mutation ist mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf und einem höheren Risiko für ein HCC assoziiert. Zudem sprechen HBeAg-negative Infektionen schlechter auf eine antivirale Therapie an, was sich z.B. in einer niedrigeren dauerhaften Ansprechrate auf IFN zeigt. Für die Behandlung mit Nukleos(tid)analoga konnte bisher kein Behandlungsendpunkt festgelegt werden, da ein Therapieerfolg nicht durch eine HBeAg-Serokonversion angezeigt werden kann. Daher ist meist eine längerfristige Therapie notwendig (Hadziyannis and Papatheodoridis 2003) (Chu, Keeffe et al. 2003).

Inaktive HBsAg-Träger:

Als inaktive HBsAg-Träger werden klinisch gesunde HBsAg-Träger bezeichnet. Erreicht wird diese Phase meist nach einer HBeAg-Serokonversion. Die HBV-DNA-Level liegen entweder unter der Nachweisgrenze oder unter 10^4 Kopien/ml, wodurch Patienten in dieser Phase nicht infektiös sind. Die Transaminasen und die Syntheseleistung der Leber sind definitionsgemäß im Normbereich, es ist höchstens eine minimale entzündliche Aktivität in der Leberbiopsie festzustellen (Cornberg, Protzer et al. 2007). Die Prognose ist vor allem bei frühem Erreichen dieser Phase relativ gut, jedoch kann es jederzeit zu spontanen Reaktivierungen kommen.

Immuntoleranter HBV-Träger:

Ein immuntoleranter HBV-Trägerstatus wird meist nach einer perinatalen Infektion oder einer Infektion in der Kindheit erreicht. Die Viruslast ist in dieser

Phase mit mehr als 10^8 Kopien/ml stark erhöht, die Transaminasen befinden sich aber im Normbereich und bioptisch ist keine Leberentzündung festzustellen. HBeAg und HBsAg sind serologisch nachweisbar. Die Progressionsrate zur Leberzirrhose ist in dieser Phase mit 5 % in zehn Jahren relativ gering (Chu, Hung et al. 2004). Nach unterschiedlich langer Krankheitsdauer von 10-40 Jahren kommt es meist zu einer Progression zu einer HBeAg-positive Infektion.

1.3 Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion

Für die Behandlung der chronischen HBV-Infektion steht bislang keine kausale Therapie zur Verfügung. Die Impfung mit rekombinantem HBsAg und Hepatitis B-Immunglobulin stellen eine wirksame Möglichkeit zur Expositions- und Postexpositionsprophylaxe dar. Als Therapeutika einer chronischen HBV-Infektion werden Interferon-(IFN-) α und Nukleos(tid)analoga eingesetzt. Das primäre Therapieziel bei der Behandlung der chronischen Hepatitis B Infektion besteht in einer dauerhaften Serokonversion von HBsAg zu anti-HBs, was einer Ausheilung gleichkommt. Da dieses Ziel aber nur in 5-10 % der Fälle erreicht wird, beschränkt sich die Therapie derzeit darauf den Verlauf abzumildern und das Risiko von Spätfolgen zu senken. Als sekundäres Therapieziel wird durch die Therapie die Infektiosität der Patienten gesenkt (Cornberg et al., 2007).

Für die Bestimmung des Therapieansprechens wurden virologische, biochemische und histologische Kriterien festgelegt. Die virologischen Kriterien umfassen die Abnahme der Viruslast unter 10^4 Kopien/ml, eine dauerhafte HBeAg-Serokonversion und im Idealfall den HBsAg-Verlust. Biochemisches Ansprechen wird als dauerhafte Transaminasennormalisierung definiert. Eine Abnahme der entzündlichen Aktivität der Leber und eine Verbesserung des Fibrose-Scores bezeichnet ein histologisches Ansprechen.

Grundsätzlich sind alle chronisch HBV-infizierte Patienten behandlungsbedürftig. Die Indikationsstellung wird in der Praxis jedoch von der

Viruslast, den Transaminasenwerten und dem Entzündungs- und Fibrosestatus der Leber abhängig gemacht. Eine Therapieindikation liegt in der immunaktiven Phase (Kap. 1.2.2) vor. Sobald die Viruslast 10^4 Kopien/ml überschreitet und die Transaminasen auf das doppelte der Norm erhöht sind, wird ohne histologische Sicherung antiviral therapiert. Sind die Transaminasen nicht eindeutig erhöht, wird der Leberzustand durch eine Biopsie überprüft, wobei bei nachweisbarer Entzündung oder signifikanter Fibrose eine Therapie begonnen wird. Eine eindeutige Therapieindikation stellt weiter eine fortgeschrittene Leberfibrose/zirrhose oder ein erhöhtes Risiko für eine Leberzirrhose oder ein HCC dar, da diese Patienten auf Grund ihrer fehlenden Leberreserve bei einem Hepatitis Schub vital gefährdet sind. Die Immuntoleranzphase und das inaktive HBsAg-Trägerstadium (Kap. 1.2.2) stellen keine Therapieindikation dar, da die HBeAg-Serokonversionsrate nach aktueller Studienlage durch eine Behandlung nicht steigt. Patienten in diesem Stadium müssen aber regelmäßig überwacht werden, um bei einer Aktivierung die antivirale Therapie beginnen zu können (Cornberg, Protzer et al. 2007). Die Beschränkung der Therapieindikation auf die immunaktive Phase begründet sich zudem in der Vorbeugung einer Resistenzentwicklung unter der Therapie (Kap. 1.3.2.2) (Shaw, Bartholomeusz et al. 2006).

1.3.1 Interferon- α , PEG-Interferon- α 2

Für die Therapie der chronischen HBV-Infektion mit Interferon (IFN) stehen Standardinterferon-(IFN-) α und ein entsprechendes Depotpräparat, PEG-Interferon- α 2a zur Verfügung. Das Depotpräparat hat durch die Pegylierung eine längere Halbwertszeit und muss nur einmal wöchentlich im Vergleich zur dreimal wöchentlichen Gabe von Standard-IFN appliziert werden. Beide Formen zeigen äquivalentes Therapieansprechen (Tillmann, 2007). IFN- α ist das einzige im Moment verfügbare Medikament, das über eine Eliminierung der cccDNA aus den Hepatozyten kurativ wirken kann. Es unterdrückt die

Virusreplikation und verstärkt die Immunantwort durch eine Steigerung der MHC-I Expression. IFN wird für die Behandlung der HBeAg-positiven und negativen chronisch aktiven HBV-Infektion mit kompensierter Lebererkrankung, maximal Child-Pugh A eingesetzt, da die immunmodulatorische Wirkung während der Therapie zu einem Aufflammen der Leberentzündung mit akutem Leberversagen führen kann (Ganem and Prince 2004). Der Therapieerfolg mit Subpression/Repression der Virusreplikation, Normalisierung der Transaminasen und einer HBeAg-Serokonversion liegt abhängig vom Genotyp bei 25-40 % (Kap. 1.1.4). Eine Metaanalyse IFN-behandelter HBeAg-positiver Infektionen belegt den Vorteil der IFN-Therapie, wobei im Vergleich zur Placebogruppe in der Therapiegruppe 24,2 % eine Normalisierung der Transaminasen, 24,3 % eine HBeAg-Serokonversion und 5,6 % eine HBsAg-Serokonversion zeigten. Auch im Langzeitverlauf zeigt die IFN-Therapie gute Resultate, wobei leberbezogene Todesfälle unter Therapie von 8,7 % auf 4,9 % sanken (Craxi, Di Bona et al. 2003). Die IFN-Therapie ist primär auf 12 bis 24 Wochen angelegt, wobei bei HBeAg-negativer Infektion die Therapiedauer auf Grund höherer Rückfallraten auf bis zu 2 Jahre ausgedehnt werden kann (Manesis and Hadziyannis 2001; Tillmann 2007).

1.3.2 Nukleos/tidanaloga

Neben IFN sind derzeit Nukleos/tidanaloga zur Therapie der chronischen HBV-Infektion zugelassen, welche alle in die Klasse der nukleos/tidischen reverse Transkriptase-Inhibitoren gehören. Sie werden in drei Gruppen unterteilt: L-Nukleoside, Nukleotide und Desoxyguanosinanaloga. Während viele Nukleos/tidanaloga aus der HIV-Therapie übernommen wurden, wurde als erstes L-Nukleosid speziell für die Therapie der chronischen HBV-Infektion 1999 Lamivudin (Zeffix®) zugelassen, als zweites 2007 Telbivudin (Sebivo®). Weitere L-Nukleoside, wie Emtricitabine (Emtriva®) und Clevudine befinden sich in klinischen Studienphasen. Adefovir dipivoxil (Hepsera®) wurde als erstes Nukleotidanalogen 2003 in Europa anerkannt, Tenofovir (Viread®) ist seit April

2008 als weiteres Nukleotidanalogen auf dem Markt. Das Deoxyguanosinanalogen Entecavir (Baraclude®) ist seit 2006 für die Behandlung der chronischen Hepatitis B zugelassen. Anzumerken ist, dass die Therapie mit Nukleos/tidanaloga durch die relativ häufige Selektion von Therapieresistenzmutationen limitiert ist (siehe Kap. 1.3.2.1 und 1.3.2.2).

1.3.2.1 Definition von Therapieresistenz

Eine Therapieresistenz kann zu konsekutivem Therapieversagen mit Anstieg der Viruslast und Progression der Leberentzündung führen. Unter Therapie mit Nukleos/tidanaloga kann es zu primärem und sekundärem Therapieversagen kommen, wobei definitionsgemäß von primärem Therapieversagen gesprochen wird, wenn nach dreimonatiger Therapie kein Abfall der Viruslast um wenigstens eine log-Stufe zu erkennen ist. Sekundäres Therapieversagen tritt nach primärem Therapieansprechen auf und ist auf die Selektion von Resistenzmutationen gegenüber der antiviralen Therapie zurückzuführen. Es wird hierbei eine genotypische, virologische und klinische Resistenz unterschieden. Als genotypische Resistenz werden Mutationen im HBV-Genom bezeichnet, die unter der antiviralen Therapie selektiert werden und zum Wirkungsverlust des Medikaments führen können. Virologische Resistenz ist gekennzeichnet durch den Anstieg der Viruslast nach primärem Ansprechen um mehr als eine log-Stufe. Klinische Resistenz bezeichnet das Ansteigen der Transaminasen auf mehr als das Doppelte der Norm (Normwert: 35 IU/l) und eine Verschlechterung der Leberhistologie. Die klinische Resistenz tritt meist einige Monate nach der virologischen Resistenz auf, diese wiederum nach der Entwicklung einer genotypischen Resistenz (Cornberg, Protzer et al. 2007).

1.3.2.2 Selektion von Resistenzmutationen gegenüber

Nukleos/tidanaloga

Im Verlauf der Therapie mit Nukleos/tidanaloga kann es zur Selektion von Resistenzmutatanten gegenüber den Nukleos/tidanaloga kommen. Ursächlich

dafür sind die hohe Virusreplikationsrate und die fehlende „proof-reading“-Funktion der viralen Polymerase, die die Bildung mutierter HBV-Stämme, so genannter Quasispezies während der Virusreplikation fördern. Die Mutationsrate von HBV ist im Vergleich mit anderen DNA-Viren sehr hoch ($1-4 \times 10^{-5}$ Basensubstitutionen/Position/Jahr (BS/P/J)). Sie ist zwar geringer als bei Retroviren ohne „proof-reading“-Funktion ($1-2 \times 10^{-5-6}$ BS/P/J), jedoch deutlich höher als z.B. bei Herpesviren (Girones and Miller 1989). Die Entstehung von Resistenzmutationen wird weiter durch die lange Halbwertszeit der cccDNA von 6 bis 10 Tagen begünstigt, die bei infizierten Hepatozyten durch die ständige Erneuerung über den intrazellulären Infektionsweg sogar über 30 Tagen liegen kann (Kap. 1.1.3). Kommt zur Bildung der Quasispezies und der langen Viruspersistenz der Selektionsdruck einer antiviralen Therapie, können aus dem Pool der Quasispezies Resistenzmutanten gegenüber den Nukleos/tidanaloga selektiert werden, welche mit der Zeit über den Wildtypstamm dominieren und ein Therapieversagen auslösen können (Zoulim 2004).

Die verschiedenen Nukleos/tidanaloga selektieren unterschiedliche und je nach ihrer genetischen Barriere unterschiedlich schnell Resistenzmutationen. Die genotypische Resistenzentwicklung verläuft z.B. unter Adefovir-(ADV-)Therapie langsamer als unter Lamivudin-Therapie, wobei unter ADV-Therapie nach einem Jahr für gewöhnlich keine Resistenzmutationen nachzuweisen sind. Die Resistenzrate steigt dann aber kontinuierlich auf 29 % im fünften Jahr (0 %, 3 %, 11 %, 18 % bzw. 29 %). Unter Lamivudin-Therapie entwickeln schon im ersten Jahr etwa 22 % der Patienten Resistenzmutationen, im zweiten, dritten, vierten und fünften Jahr respektive 38 %, 52 %, 66 % und 69 % (Abb. 8). Zwei ADV-Resistenzmutationen sind bisher in der Literatur beschrieben rtA181V und rtN236T (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Die bekannten Resistenzmutationen liegen im katalytischen Zentrum, dem YMDD-Motiv (Tyrosin, Methionin, Aspartat, Aspartat) des HBV-Polymeraseproteins (rtM204S/I/V) und weiter an den Aminosäurepositionen rtL180M und rtA181T. Unter Lamivudin-Therapie

werden zudem die Mutationen rtL80V und rtV173L in Kombination mit der Resistenzmutation rtM204S/I/V als kompensatorische Mutationen selektiert, welche die Replikationseffizienz der mutierten Virusstämme erhöhen (Delaney, Yang et al. 2003). Unter Telbivudin-Therapie werden die gleichen Mutationen wie unter Lamivudin-Therapie selektiert. Bei einer Entecavir-Therapie führen Mutationen an den Aminosäurepositionen rtT184G/S und rtS202I zu einer Therapieresistenz. Für Tenofovir sind bislang keine Resistenzmutationen bekannt, jedoch müssen die Langzeitergebnisse der Therapiestudien abgewartet werden (Tab. 1).

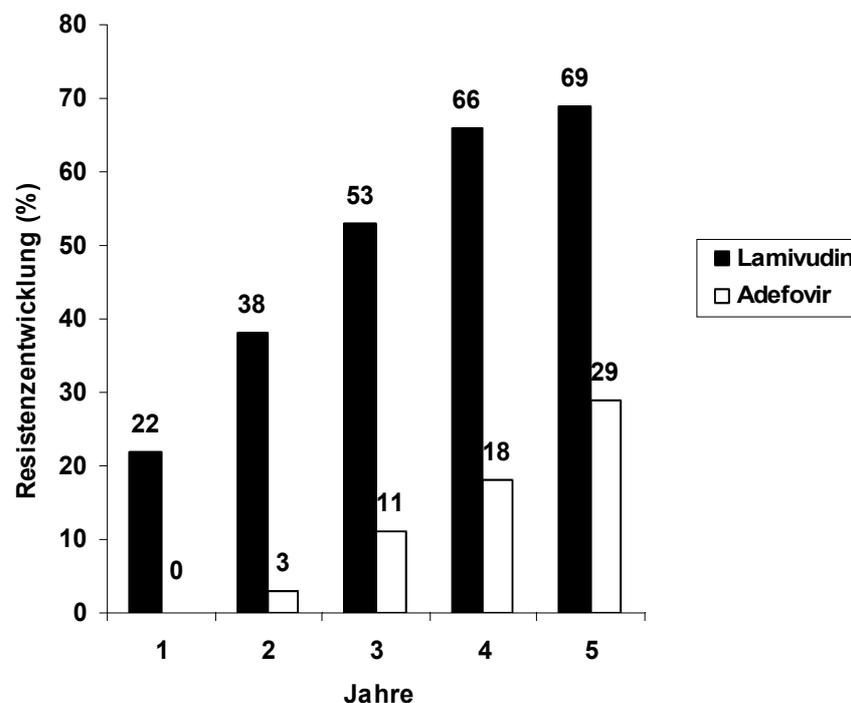


Abb. 8: Vergleich der Resistenzentwicklung einer Lamivudin- und Adefovir-Therapie über einen Zeitraum von fünf Jahren (in Anlehnung an (Tillmann 2007)).

Tab. 1: Resistenzprofile der Nukleos/tidanaloga: +, Medikamentenresistenz bei dieser Mutation (+), Resistenzen werden nur in Kombination mit anderen Mutationen beobachtet.

Entecavirresistenzen an den Stellen rtT184G/S, rtS202I und rtM250V treten nur in Kombination mit Mutationen an den Stellen rtL180M und rtM204V auf.

	Nukleosidanaloga			Nukleotidanaloga	
	Lamivudin	Telbivudin	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
rtL180M	+	+	(+)		
rtA181V/T	+			+	
rtT184G/S			+		
rtS202I			+		
rtM204V	(+)	(+)	(+)		
rtL180M+rtM204V	+	+	(+)		
rtM204I	+	+	?		
rtM204S	+		?		
rtN236T			?	+	
rtI169T+rtM250V			+		

1.3.2.3 Therapie mit Nukleos/tidanaloga und klinische Relevanz der HBV-Polymerasegenmutationen

Das Auftreten und die Vermeidung der Selektion von Resistenzmutationen gegenüber Nukleos/tidanaloga stellt eine klinische Herausforderung dar. Zur Vermeidung der Selektion von Resistenzmutationen muss die Virusreplikation möglichst schnell und vollständig unterdrückt werden. Bei der Wahl eines

Therapeutikums muss seine antivirale Effektivität, die Dauerhaftigkeit des Ansprechens und die Resistenzbarriere mit dem Stadium der Lebererkrankung abgestimmt werden. Bei einer Viruslast unter 10^6 Kopien/ml und nach Ausschluss einer Leberzirrhose kann jedes zugelassene Nukleos(tid)analogon eingesetzt werden. Ab einer Viruslast von mehr als 10^6 Kopien/ml muss mit einem stärker antiviral wirksamen Medikament als z.B. Lamivudin therapiert werden, da das Auftreten einer Lamivudinresistenz bei hoher Viruslast wahrscheinlicher ist (Yuen et al., 2001). Bei sehr hoher Viruslast über 10^9 Kopien/ml sollten Medikamente mit hoher antiviraler Wirkung und hoher Resistenzbarriere wie Entecavir oder Tenofovir eingesetzt werden oder primär eine Kombinationstherapie begonnen werden (Cornberg, Protzer et al. 2007). Die Therapie muss durch die Kontrolle der Viruslast und der Transaminasen regelmäßig überwacht werden, um die Selektion resistenter Virusvarianten erkennen zu können und über eine Therapieanpassung eine hepatische Dekompensation verhindern zu können (Fung, Andreone et al. 2005). Bei einem primären Nicht-Ansprechen muss nach einer Behandlungsdauer von sechs Monaten die Therapie angepasst werden (Cornberg, Protzer et al. 2007).

Da die Nukleos(tid)analoge alle zu einer Medikamentenklasse gehören und über ähnliche Mechanismen die HBV-Polymerase angreifen, besteht die Gefahr von Kreuzresistenzen zwischen den Nukleos(tid)analoge. Lamivudin zeigt zum Beispiel eine Kreuzresistenz gegenüber anderen L-Nukleosidanaloga wie Telbivudin und ein reduziertes Ansprechen auf Entecavir, jedoch keine Kreuzresistenz gegenüber den Nukleotidanaloga ADV und Tenofovir. Bei einer ADV-Resistenz mit der Mutation rtN236T ist die Wirkung von Tenofovir reduziert, die L-Nukleosidanaloga und Entecavir wirken weiterhin. Die ADV-Resistenzmutation A181V beeinträchtigt die Wirkung von Lamivudin (Tab. 2) (Brunelle, Jacquard et al. 2005; Locarnini 2005). Da die Kreuzresistenzprofile bei einer Therapieanpassung genau beachtet werden müssen, bietet sich für die Therapieplanung eine genotypische Analyse der Polymerasegenmutationen an (Locarnini, Hatzakis et al. 2004).

Tab. 2: Zusammenfassung der Kreuzresistenzprofile der Nukleos/tidanaloga.

	Resistenzmutationen		
	Lamivudin-Resistenz (rtL180M, rtM204V)	ADV-Resistenz (rtN236T)	ADV-Resistenz (rtA181V)
Medikamente mit beeinträchtiger Sensitivität	Entecavir Telbivudin	Tenofovir	Lamivudin
Weiterhin wirksame Medikamente	Adefovir Tenofovir	Lamivudin Entecavir Telbivudin	Tenofovir Entecavir

Vergleiche der HBV-Therapie mit der antiviralen HIV-Therapie und die bisherigen Erfahrungen mit der HBV-Therapie lassen vermuten, dass eine Monotherapie mit einem Nukleos/tidanalogen auf Dauer die Selektion von Resistenzmutationen nicht verhindern kann. Sinnvolle Kombinationstherapien mit verschiedenen Medikamenten zur Verhinderung der Selektion der Resistenzmutationen werden aktuell diskutiert. Eine Kombinationstherapie aus Lamivudin und ADV unterscheidet sich im Vergleich mit einer Lamivudin-Monotherapie nicht im virologischen und biochemischen Ansprechen, jedoch sind signifikant weniger Lamivudin-Resistenzen zu beobachten (Cornberg, Protzer et al. 2007). Wird bei einer Lamivudin-Resistenz ADV für die Therapieanpassung als „add-on“-Therapie zu Lamivudin dazugegeben, sinkt das Risiko einer ADV-Resistenz im Vergleich zur ADV-Monotherapie von 5 % auf 0,8 % (Lampertico, Vigano et al. 2007).

Die Behandlung der chronischen Hepatitis B mit Nukleos(tid)analoga ist zunächst dauerhaft anzusetzen. Eine HBeAg-positive HBV-Infektion wird nach einer HBeAg-Serokonversion noch mindestens sechs bis zwölf Monate weiterbehandelt, da bei kürzerer Nachbehandlungszeit das Rückfallrisiko erhöht ist (Chien, Yeh et al. 2003). Bei HBeAg-negativen Patienten konnte bisher kein Therapieendpunkt definiert werden und es wird daher eine Langzeittherapie empfohlen (Hadziyannis, Tassopoulos et al. 2006). Ein definiertes Therapieende ist eine HBsAg Serokonversion und ein anti-HBs Titer von mehr als 100 IU/l (Cornberg, Protzer et al. 2007).

1.3.2.4 Weitere relevante Mutationen im HBV-Genom

Der Polymerase-Leserahmen (ORF) ist mit 80 % der HBV-Sequenzen der längste der kodierenden Regionen im HBV-Genom. Der Polymerase-ORF überlappt mit den drei anderen ORFs, PräS/S-ORF, Präcore/Core-ORF und dem X-ORF (Kap. 1.1.2.2), wodurch bei der Selektion von Mutationen unter antiviraler Therapie neben dem HBV-Polymerase-ORF auch andere ORFs betroffen sein können. Mutationen, die den PräS/S-ORF betreffen, können die Antigenität des Oberflächenproteins HBsAg verändern und zu einem Impfversagen führen. Die Mutation G145R verändert die immunogene a-Determinante des HBsAg in der Weise, dass die durch die Impfung induzierten HBs-Antikörper das Hepatitis B Virus nicht mehr neutralisieren können (Locarnini 2005).

Weitere relevante Mutationen im HBV-Genom außerhalb des Polymerase-ORF stellen die Mutationen A1762T und G1764A im Präcore-Promotor, basalen Core-Promotor (BCP) dar, welche zu HBeAg-negativen Infektionen führen (Kap. 1.2.2). Eine weitere Gruppe an Mutationen mit Einfluss auf die HBeAg Produktion stellen die Präcore-Stopp-Codon Mutationen G1896A und G1858T. Die daraus resultierende verminderte HBeAg Bildung verstärkt die Virusreplikation und führt zu einer schweren Entzündung. Stopp-Codon Mutationen und BCP-Mutationen, v.a. K130M und V131I, im X-Gen führen zu

trunkierten X-Proteinen, die über ihren Einfluss auf die HBV-Replikation mit dem Auftreten eines HCC assoziiert sind (Abb. 9).

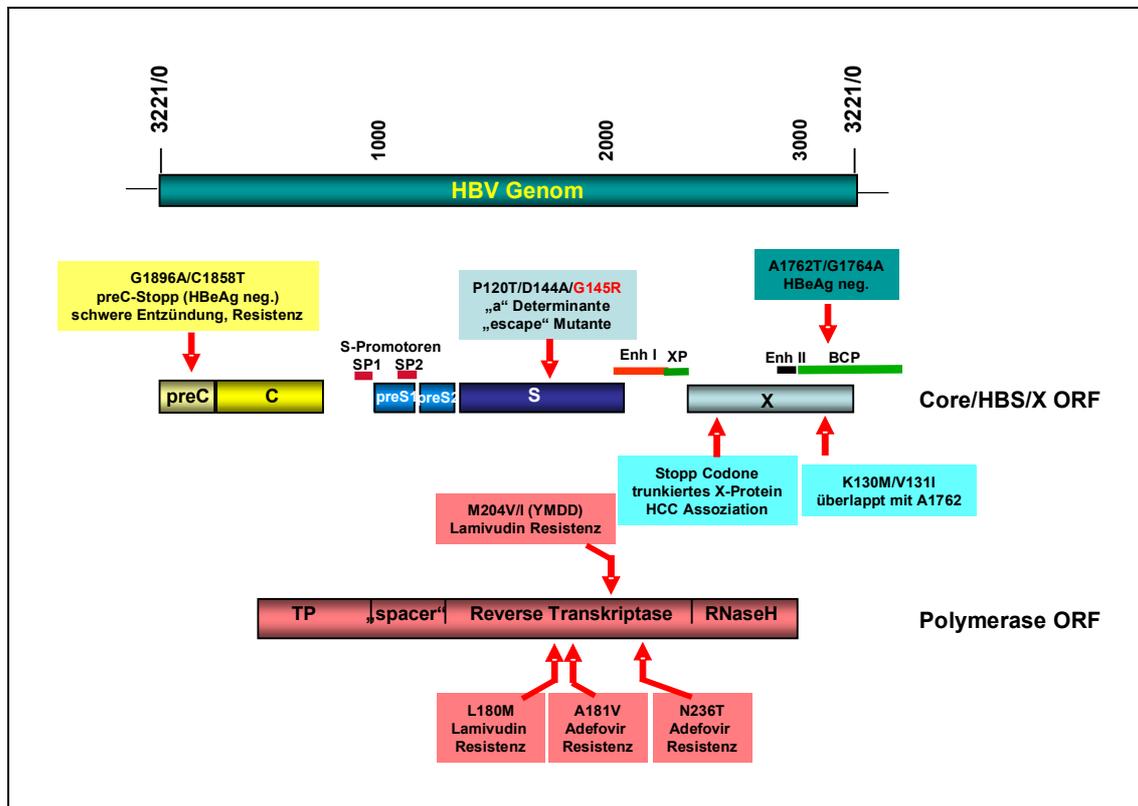


Abb. 9: Häufige Mutationen im HBV-Genom und ihre Folgen: Polymerasegenmutationen, Präcore-/Coregenmutationen, X-Genmutationen und „escape“ Mutation im S-Gen (in Anlehnung an (Bock 2006)).

1.3.3 Adefovir dipivoxil, Handelsname HEPSERA®

Adefovir dipivoxil (ADV) ist unter dem Handelsname HEPSERA® erhältlich und ist seit 2003 für die Therapie der chronischen HBV-Infektion zugelassen. Adefovir dipivoxil (9-[2-[[bis[(pivaloyloxy)methoxy]-phosphinyl]-methoxy]ethyl]adenin) gehört zu den azyklischen Nukleosidphosphaten (Abb. 10). Es wird als Diester-Prodrug intrazellulär von zellulären Kinasen zum aktiven Metaboliten Adefovir phosphoryliert (Merta, Votruba et al. 1992) und inhibiert als aktiver Metabolit die HBV-DNA Polymerase, indem es bei der DNA-

Synthese in die virale DNA eingebaut wird und dadurch einen Kettenabbruch verursacht. Weiter wirkt es als kompetitiver Hemmer des natürlichen Substrats dATP (De Clercq 2004).

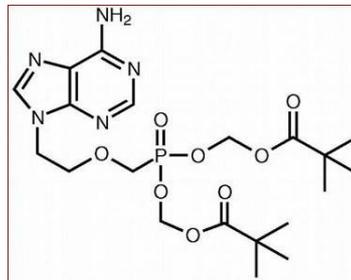


Abb. 10: Adefovir dipivoxil, Handelsname HEPSERA® (in Anlehnung an (GileadSciences 2006))

1.3.3.1 Therapie mit Adefovir dipivoxil

Eine Monotherapie mit Adefovir dipivoxil (ADV) erfolgt mit einer Tagesdosis von 10 mg, da bei dieser Dosis keine nephrotoxische Wirkung zu erwarten ist. ADV ist indiziert bei HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Infektionen, bei Lamivudin-Resistenz, vor und nach einer Lebertransplantation sowie bei einer HIV-Koinfektion. Nach einer Behandlungsdauer von einem Jahr zeigen sowohl HBeAg-positive als auch HBeAg-negative Patienten meist ein gutes Ansprechen. Als Endpunkte der Beobachtung des Therapieansprechens wurden eine Verbesserung der Leberhistologie, ein Abfall der Viruslast und Normalisierung der Transaminasen festgelegt.

Nach dem ersten Therapiejahr war verglichen mit Ausgangswerten bei 71 % der HBeAg-positiven und bei 80 % der HBeAg-negativen Patienten eine Verbesserung der Leberhistologie zu verzeichnen. 41 % der HBeAg-positiven und 48 % der HBeAg-negativen Patienten zeigten eine Verbesserung der Leberfibrose. Bei 72 % wurde eine Normalisierung der Transaminasen und bei 64% ein Abfall der HBV-DNA unter 1000 Kopie/ml beobachtet (Hadziyannis and Papatheodoridis 2003; Marcellin, Chang et al. 2003; Hadziyannis, Tassopoulos et al. 2005). Nach fünf Jahren scheint der Therapieerfolg anhaltend gut, die Leberhistologie ist bei 75 % der HBeAg-negativen Patienten verbessert, die

Transaminasen sind mit 67 % normalisiert und die Viruslast ist bei 66 % Prozent ebenfalls anhaltend gesunken (Delaney 2007) (Abb. 11). Die HBeAg-Serokonversionsrate steigt unter ADV-Therapie mit längerer Therapiedauer an und wurde bei 14 % der Patienten nach einem Jahr, bei 33 % und 46 % nach dem zweiten bzw. dritten Jahr beobachtet (Marcellin, Chang et al. 2005).

Zwei ADV-Resistenzmutationen rtN236T und rtA181V wurden bislang in der HBV-Polymerase identifiziert, wobei sie unabhängig voneinander oder kombiniert auftreten können (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003)(Kap. 1.3.2.1). Weitere Mutationen wurden in der Literatur beschrieben und es wird kontrovers diskutiert, ob sie maßgeblich an einem Nicht-Ansprechen oder einer Resistenz gegenüber der ADV-Therapie beteiligt sind, wie z.B. rtV84M, rtS85A, rtN134D, rtA181T, rtT184S, rtQ215S, rtI233V, rtP237H, rtN238T/D (Bartholomeusz 2004; Gerolami, Bourliere et al. 2006; Schildgen, Sirma et al. 2006). In phänotypischen Assays zeigen die Mutationen rtN236T und rtA181V eine deutliche Reduktion im Ansprechen auf ADV im Vergleich zum Wildtyp, die Mutation rtN236T je nach Untersuchung 7-14fach, die Mutation rtA181V 4fach (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003; Delaney 2007). Als Risikofaktor für die Selektion einer ADV-Resistenz konnte bisher nur die Viruslast ausgemacht werden, wobei das geringste Risiko besteht, wenn die Viruslast im ersten Therapiejahr unter 1000 Kopien/ml sinkt. Alter, Geschlecht, Rasse, BMI, HBV-Genotyp, Transaminasenwerte oder nekroinflammatorische Scores der Leber scheinen keinen Einfluss zu haben (Delaney 2007). Eine primäre Resistenz gegen ADV kommt in ungefähr 10 % vor. Bei dieser finden sich meist Wildtyp Sequenzen in der reversen Transkriptase, weshalb unter anderem Polymorphismen in den Medikamententransportern für die primäre Resistenz verantwortlich gemacht werden könnten (Tillmann 2007).

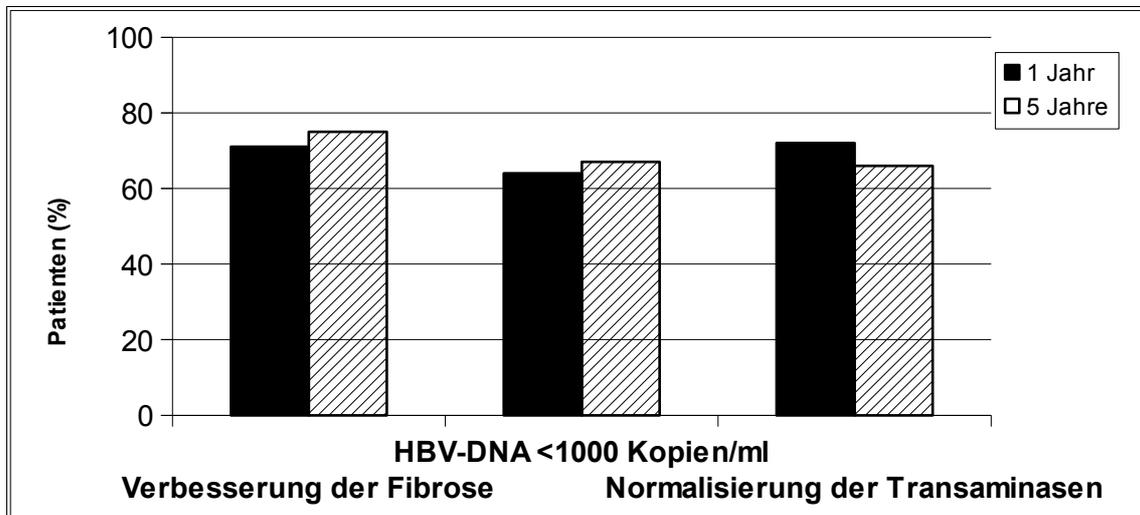


Abb. 11: Darstellung der Behandlungsendpunkte nach einem bzw. fünf Jahren: Verbesserung der Leberfibrose, HBV-DNA unter 1000 Kopien/ml und Normalisierung der Transaminasen nach einem bzw. fünf Jahren in HBeAg-negativen Patienten (in Anlehnung an (Delaney 2007)).

1.3.3.2 Analyse der Selektion von Resistenzmutationen

Die Analyse der Selektion und des Vorkommens von Resistenzmutationen erfolgt genotypisch und phänotypisch. Die genotypische Analyse ermöglicht die Analyse der Virusgenomsequenz und die Identifizierung eines einzelnen Basenaustauschs. Damit können jedoch keine Subpopulationen einzelner Quasispezies nachgewiesen werden und somit keine Aussagen über das phänotypische Erscheinen einzelner Mutationen getroffen werden. Die genotypische Analyse wird für das Management behandlungsnaiver Patienten oder nach Therapieversagen eingesetzt, um nach der Analyse der Virussequenz die passende Therapie wählen zu können. Die phänotypische Analyse gestattet eine quantitative *in vitro* Messung des Verhaltens und des Ansprechens einzelner HBV-Stämme mit spezifischen Mutationen gegenüber Nukleos(tid)analoga, von der auf die *in vivo* Effizienz eines Medikaments geschlossen werden kann. Genotypische und phänotypische Analysen können gemeinsam dazu beitragen die Resistenzmechanismen der Nukleos(tid)analoga

besser verstehen zu können und so den Einsatz der antiviralen Medikamente weiter optimieren zu können. Die Interpretation der Ergebnisse muss jedoch mit dem klinischen Erscheinungsbild der Patienten abgeglichen werden, da die genotypische und phänotypische Analyse allein nicht genügt, um das komplexe Geschehen der Resistenzentwicklung zu beurteilen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine kausale Therapie der chronischen HBV-Infektion steht bislang nicht zu Verfügung. Während die Impfung und Gabe von Hepatitis B Immunglobulin eine wirksame Expositions- und Postexpositionsprophylaxe darstellen, sind die Therapieoptionen mit Interferonen (IFN- α und PEG-IFN) und Nukleos/tidanaloga sehr begrenzt. Die Therapie mit Interferonen ist durch ein breites Nebenwirkungsspektrum, die Therapie mit Nukleos/tidanaloga, durch Selektion von Resistenzmutationen im Therapieverlauf limitiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand von virologischen und klinischen Daten eines ausgewählten Kollektivs chronisch HBV-infizierter Patienten sowie in funktionellen Zellkulturexperimenten die Selektion und das Vorkommen von Resistenzmutationen unter antiviraler Therapie mit Nukleos/tidanaloga insbesondere dem Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil (Hepsera[®]) (ADV) zu untersuchen und zu charakterisieren. Es sollten dabei in einer retrospektiven anonymisierten Analyse zunächst klinische sowie virologische Parameter untersucht werden, die eine Resistenzentwicklung beeinflussen können. Bislang sind zwei Resistenzmutationen rtN236T und rtA181V im reverse Transkriptasegen des HBV-Poymerasegens beschrieben, welche unter ADV-Therapie selektiert werden. Es besteht der Verdacht, dass neben den ADV-Resistenzmutationen rtN236T und rtA181V andere Mutationen im HBV-Polymerasegen im Therapieverlauf selektiert werden können. In den hier vorliegenden genotypischen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob bislang nicht identifizierte ADV-Resistenzmutationen gefunden werden, die mit einem Therapieversagen gegenüber ADV assoziiert sein könnten. Der Einfluss der neu identifizierten Mutationen auf die ADV-Behandlung sollte anschließend in funktionellen phänotypischen Untersuchungen analysiert werden. Die Identifikation neuer Resistenzmutationen hat weitreichende Konsequenzen für das antivirale Therapiemanagement chronisch HBV-infizierter Patienten.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen, Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen Sigma Aldrich, Roth und VWR International (Merck) bezogen. Die Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (Millipore) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert (0,22 µm Filtermembran).

2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS:

NaCl	1,4 M
KCl	27 mM
NaHPO ₄ (7H ₂ O)	150 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM

pH 7,4 mit HCl einstellen

TAE-Puffer:

Tris	40 mM
EDTA	2 mM
NaCl	5 mM

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen

SDS: wässrig; Dodecylsulfat-Natriumsalz, 10 % oder 20 %

Tris-Puffer: Tris(hydroxymethylaminomethan) als 1 M wässriger Puffer, pH 7,5 oder 8,0 mit konzentrierter HCl einstellen

Ethidiumbromid: 10 µg/ml in 1x TE

2.1.2 Lösungen für die Zellkultur

Lösung für die Zellkultivierung

DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) mit 10 % FKS (Fötale Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO)

2.1.3 Puffer und Lösungen für Bakterienzucht

LB-Medium (Luria Bertani)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glukose	1 g
H ₂ O	ad 1l

pH 7,5 mit NaOH einstellen; autoklavieren

LB-Agar Platten

LB-Medium + 1,5 % Agar

nach dem Autoklavieren auf ca. 60°C abkühlen lassen, Antibiotikum dazugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern

Verwendetes Antibiotikum

Ampicillin, Endkonzentration: 100 µg/ml

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Glukose 20 mM
 H₂O ad 1l
 autoklavieren und bei 4 °C lagern

2.2 Kommerzielle Kits

Die Verwendung der Kits erfolgte nach Herstellerprotokoll.

ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kit v2.0	Applied Biosystems
NucleoBond PC 500 (Maxipräp)	Macherey Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel
NucleoSpin RNA II	Macherey Nagel
pGEMTeasy	Promega
NucleoSpin Extract II Macherey	Macherey Nagel
Quik Change II Site-Directed-Mutagenesis Kit	Stratagene
Taqman Master Mix	Applied Biosystems
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen

2.3 Enzyme

T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs
DNase-I	Roche
Proteinase K	Qiagen

2.4 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Nunc, Kimberley Clark, Neolab, Greiner, Sarstedt, Eppendorf, Biomol, Millipore, Bio-Rad und Schleicher Schuell bezogen.

2.5 Geräte und Zubehör

Brutschrank	Heraeus
Elektrotransformator Gene Pulser	Bio-Rad
Elektrophoresekammer für Agarosegele: Owl	Peqlab
Feinwaage MC1	Sartorius
Quarzküvetten	Bio-Rad
Kapillarsequenzierer ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop: IMT-2 Phasenkontrast KLWCD 0.30	Olympus
Neubauer-Zählkammer	Brand
Photometer: SmartSpec 3000	Bio-Rad
pH-Meter pH 525	WTW
Pipetten	Gilson
Sterilwerkbänke LaminAir HB2448	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
PCR-Geräte: Primus 25 Advanced	Peqlab
Tgradient Thermocycler	Biometra
Tpersonal 48 Thermocycler	Biometra
Pipettierhilfe Accu-Jet, Accu-JetPro	Neolab
Waage Sartorius Basic	Sartorius
Vortex VF2	Janke & Kunckel
Zellbrutschrank Typ 6000	Heraeus
Zentrifugen: Hermle ZK 380	Eppendorf
Sorvall RT 6000D, Rotor: H1000B	Sorvall
Sorvall MC 12V, Rotor F-12/M.18	Sorvall
Zentrifugenflaschen für Rotator GSA: DRY-SPIN Bottle	Sorvall

2.6 Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

Tab. 3: Primer für die nested-PCR im HBV S-Gen

PCR-Nr.	Name	Sequenz
1. PCR:	HB 134 s	5'-TGC TGC TAT GCC TCA TCT TC-3'
	HB 135 as	5'-CAG AGA CAA AAG AAA ATT GG-3'
2. PCR:	HB 75 s	5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT GTG CCT-3'
	HB 94 as	5'-GGT ATA AAG GGA CTC ACG ATG-3'

Tab. 4: Primer für die Mutagenese, die veränderte Base ist rot markiert

Name	Sequenz
E263D s	5'-GTC CTT GCC ACA AGA t CA CAT CAT ACA AAA AA-3'
E263D as	5'-TT TTT TGT ATG ATG TG a TCT TGT GGC AAG GAC-3'
N248H s	5'-GG GGT TAC TCT CTA c AT TTT ATG GGT TAT GTC-3'
N248Has	5'-GAC ATA ACC CAT AAA AT g TAG AGA GTA ACC CC-3'
A38T-s	5'-CCT CAC AAT ACC a CA GAG TCT AGA CTC G-3'
A38T-as	5'-C GAG TCT AGA CTC TG t GGT ATT GTG AGG-3'
L231V-s	5'-TTT CTT TTG TCT g TG GGT ATA CAT TTA AAC-3'
L231V-as	5'-GTT TAA ATG TAT ACC CA c AGA CAA AAG AAA-3'
D134N-s	5'-ATG CCG GAC CTG CAT a AC TAC TGC TCA AGG A-3'
D134N-as	5'-T CCT TGA GCA GTA GT t ATG CAG GTC CGG CAT-3'

Tab. 5: Primer für die PCR-Reaktion der Amplifikation und Sequenzierung des klonierten Genabschnitts.

Aminosäure- position	Name	Sequenz
E263D	HBV-sense	5'-TGG CTC AGT TTA CTA GT-3'
	HBV-antisense	5'-CAT CAA CGC AGG ATA AC-3'
A38T	HBV-FW-153S	5'-GAA CAT GGA GAA CAT CAC-3'
	HBV-RW-471AS	5'-GGA ATT AGA GGA CAA ACG-3'
N134D	HBV-FW-443S	5'-TTC TTC TGG ACT ATC AAG G-3'
	HBV-RW-769AS	5'-ACT CAA GAT GCT GTA CAG-3'

Tab. 6: TaqMan-Primer und TaqMan-Probe zur Quantifizierung der HBV-DNA. Die TaqMan-Probe ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM/TAMRA markiert.

Name	Sequenz
HBV-580F	5'-GCCTCGCAGACGCAGATC-3'
HBV-643R	5'-ACATTGAGATTCCCGAGATTGAG-3'
HBV-Taqprobe	5'-(FAM)-CCATCGCCGCGTCCGAGAAG-(TAMRA)-3'

2.7 Identifizierung und Analyse von Mutationen im HBV- Polymerasegen

2.7.1 Studiendesign und Datenerhebung

Für die Untersuchung zum Auftreten und Vorkommen von Resistenzmutationen im HBV-Polymerasegen gegenüber der antiviralen Therapie mit Nukleos(tid)analoga wurden 276 Patientenserumproben chronisch HBV-infizierter Patienten untersucht. Die Studie wurde an bereits vorhandenen Patientenmaterialien der Routinediagnostik der diagnostischen Abteilung der molekularen Pathologie Tübingen durchgeführt und im Sinne einer historischen Studie retrospektiv und anonymisiert ausgewertet. Daher war nach Rücksprache mit der Ethikkommission der Universität Tübingen (Prof. Dr. Luft) kein eigenes Ethikvotum notwendig.

Für die Auswertung wurden bevorzugt mit ADV behandelte Patienten ausgewählt. Die serologischen und klinischen Angaben wurden aus anonymisierten Arztbriefen der überweisenden Ärzte eruiert. Das Alter, die Viruslast vor und während der Behandlung mit Adefovir dipivoxil (ADV), leberspezifische Parameter wie der Transaminasewert Alaninaminotransferase (ALT), sowie weitere spezifische serologische Parameter einer HBV-Infektion, HBeAg- und anti-HBe-Status wurden in der Auswertung berücksichtigt. Eine Vorbehandlung mit Lamivudin und Interferon- α ging ebenfalls in die Auswertung mit ein.

Die Erhebung der virologischen Parameter wie Viruslast, der HBV-Genotyp und die Mutationsanalyse wurden in eigener Arbeit sowie mit Unterstützung der

molekularpathologischen Diagnostik der Abteilung für Molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie durchgeführt. Die im Rahmen der Diagnostik ermittelten Ergebnisse zur Genotypisierung und Mutationsanalyse bei ADV-Therapieresistenz standen dem vorliegenden Forschungsprojekt unmittelbar zur Verfügung. Aus dem EDTA-Blut der Patienten mit ADV-Therapieresistenz wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) die HBV-DNA isoliert und unter Verwendung einer nested-PCR qualitativ nachgewiesen (Tab. 3 und Kap.2.8.2.7), während die Viruslast in einer TaqMan®-Realtime-PCR quantitativ bestimmt wurde (Tab. 6 und Kap. 2.8.2.8). Der patientenspezifische Genotyp wurde durch eine Sequenzierung des PCR-Produkts des S-Gens (Kap. 2.8.1.7) und einen anschließenden Sequenzabgleich mit Referenzsequenzen der Gendatenbank NCBI NHI bestimmt (Tab. 7).

Um die unter der antiviralen Therapie entstandenen Mutationen im HBV-Polymerasegen bzw. in der reversen Transkriptase zu charakterisieren, wurde die HBV-reverse Transkriptase-(RT-) Domäne von Aminosäure 1 bis 344 sequenziert und auf Basenabweichungen im Vergleich zum Referenzstamm untersucht (Tab. 7). Die Nummerierung der reversen Transkriptase des HBV-Genoms entspricht dem Konsens des HEP DART Internationalen Komitees (Stuyver et al., 2001). Um trotz der Länge der reversen Transkriptase von 1032 Nukleotiden geeignete PCR-Produkte für eine exakte Sequenzierung zu erhalten, wurde die PCR-Reaktion für die Sequenzierung in überlappenden Fragmenten durchgeführt (Abb. 12). Das Ziel der weiteren Untersuchungen war die analysierten Mutationen in der HBV-RT-Domäne mit dem Ansprechen auf die ADV-Therapie zu korrelieren. Dadurch sollten mögliche neue Resistenzmutationen im HBV-Polymerasegen identifiziert und diese anschließend phänotypisch charakterisiert werden (Kap. 2.8).

2.7.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm „SPSS“ in Zusammenarbeit mit Professor Dr. H.-L. Tillmann, Medizinische Klinik und

Poliklinik II des Universitätsklinikums Leipzig. Die Variablen wurden in einem zweiseitigen Chi-Quadrat oder Exakten Test nach Fisher auf ihre Korrelation geprüft. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

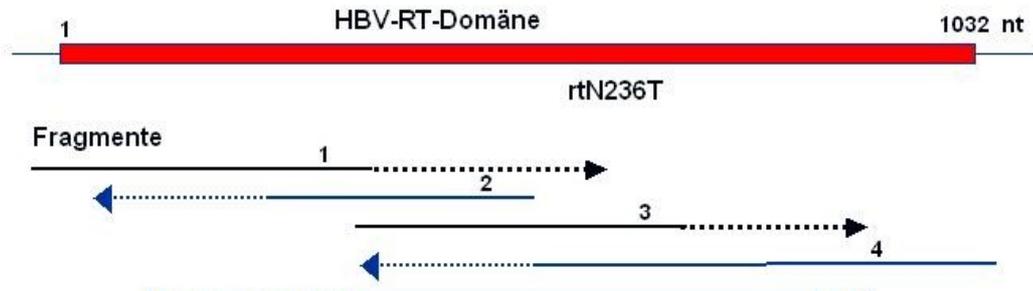


Abb. 12: Schema der Fragment-PCR mit vier Fragmenten für die Sequenzierung der HBV-reverse Transkriptase-Domäne, als Beispiel ist die rtN236T ADV-Resistenzmutation angegeben. nt=Nukleotide

Tab. 7: Referenzstämme: für den Sequenzabgleich der untersuchten HBV Virus-Sequenzen.

HBV A:	Z72478 Valenzuela et al.
HBV B:	D00329 Okamoto et al.
HBV C:	X01587 Fujiyama et al.
HBV D:	V01460 Galibert et al.
HBV E :	X75657 Norder et al.
HBV F:	X75658 Norder et al.
HBV G:	AF160501 Stuyver et al.

2.8 Phänotypische Assays

Mit phänotypischen Assays sollte untersucht werden, ob die in der HBV-RT-Domäne entdeckten Mutationen das Ansprechen gegenüber ADV *in vitro* beeinflussen. Dazu wurden in das Polymerasegen eines replikationskompetenten HBV-Plasmids über eine gerichtete Mutagenese die zu untersuchenden Punktmutationen eingefügt (Kap. 2.8.1) und anschließend die Hepatomzelllinie HuH-7 mit diesem generierten replikationskompetenten HBV-

Plasmid transfiziert (Kap. 2.8.2.2). Für die phänotypische Analyse des Verhaltens der Resistenzmutationen unter antiviraler Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV wurden die transfizierten HuH-7 Zellen unter Zugabe verschiedener ADV-Konzentrationen mit Endkonzentrationen von jeweils 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM in Zellkulturmedium (Kap. 2.1.2) kultiviert. Anschließend wurde die Replikationskompetenz der Klone über eine absolute Quantifizierung der HBV-DNA bestimmt (Kap. 2.8.2.8), nachdem die viralen Kapside entweder aus dem Mediumüberstand durch eine PEG-Fällung isoliert (Kap. 2.8.2.5) oder alternativ die intrazellulären HBV-Kapside immunpräzipitiert wurden (Kap. 2.8.2.5). Das Ansprechen der Resistenzmutationen auf das Nukleotidanalogen ADV wurde an Hand von Konzentrations-Wirkungskurven im Vergleich mit der Sensitivität des HBV-Wildtypstamms gegenüber ADV kalkuliert.

2.8.1 Generierung einzelner Konstrukte durch gerichtete Mutagenese und Klonierung von Genregionen

Um eine Punktmutation in das Polymerasegen des HBV-Genoms einzuführen, wurde eine gerichtete Mutagenese durchgeführt. Die Versuche erfolgten exemplarisch mit replikationskompetenten HBV-Plasmiden des Genotyps D, Subtyp ayw. Die Mutagenese erfolgte nach Anleitung des Kits *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* von Stratagene. Dazu wurde das Polymerasegen in einem Kassettenaustausch aus dem Wildtyp-Plasmid pHBV ayw 1,28 in einen pGEM-T-Easy-Klonierungsvektor (Kap. 2.8.1.1) eingebracht. Der Kassettenaustausch erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NcoI*, wobei die *EcoRI*-Schnittstelle an der Nukleotidposition 3180 und die *NcoI*-Schnittstelle an der Nukleotidposition 1374 liegen. Das Fragment besaß somit bei einer Plasmidgröße von 3182 Basenpaaren eine Länge von 1375 Nukleotiden. Der pGEM-T-Easy-Klonierungsvektor wurde nach dem Kassettenaustausch mit den spezifischen Mutageneseprimern (Tab. 4) in einer PCR amplifiziert, wobei pGEM-T-Easy-Vektoren mit mutiertem HBV-

Polymerase-Insert entstanden. Diese wurden nach der Amplifikation mit dem Enzym DpnI verdaut, um die parentale methylierte DNA der pGEM-T-Easy-Vektoren abzubauen und die neu synthetisierte DNA zu selektieren. Die neu generierten Klonierungsvektoren (pGEM-T-Easy) wurden in elektrokompetente *E.coli*-Zellen (HB101, Statagene) transformiert (Kap. 2.8.1.4), auf LB-Ampicillin-(Amp-)Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Übernachtskultur der gewachsenen Klone wurde die Plasmid-DNA dieser Klone in einer Minipräparation isoliert (Kap. 2.8.1.5) und zur Kontrolle der Mutagenese sequenziert (Kap. 2.8.1.7).

Es folgte über einen Kassettenaustausch (s.o.) die Religation (Kap. 2.8.1.2) des mutierten HBV-Polymeraseabschnitts in den Expressionsvektor pHBV ayw 1,28. Dafür wurde aus dem Klonierungsvektor (pGEM-T-Easy) nach einer Maxipräparation das mutierte Polymerase-Insert ausgeschnitten und die zu klonierenden Vektoren und Inserts über eine DNA-Extraktion aus einem Agarosegel (NucleoSpin Extrakt II, Macherey Nagel) aufgereinigt (Kap. 2.8.1.9). Nach der Ligation wurde das erhaltene HBV-Plasmid in elektrokompetente *E.coli*-Zellen (HB101, Statagene) transformiert, auf selektive LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Plasmid-DNA-Isolation mit einer Minipräparation (Kap. 2.8.1.5), wobei anschließend die Ligation mittels eines Restriktionsverdau überprüft wurde. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Insert um das gewünschte Polymerasefragment handelte, wurde nach einer Maxipräparation (Kap. 2.8.1.5) das Plasmid des potentiell positiven Klons sequenziert.

2.8.1.1 Vektoren und Plasmide

pGEM-T-Easy	Klonierungsvektor mit T-Überhang (Promega)
pHBV ayw 1,28	Plasmid des Wildtyp-HBV-Genoms Genotyp D, Subtyp ayw, mit 1,28facher Überlänge
pHBV 1,28 adw2	Plasmid des Wildtyp-HBV-Genoms Genotyp A, Subtyp adw2 mit 1,28facher Überlänge

pHBV ayw N248H	Mutation an der Aminosäureposition 248 im Polymerasegen Genotyp D, Subtyp ayw
pGEM ayw wt	pGEM-T-Easy mit Wildtyp-Polymerasegenabschnitt des HBV Genotyp D, Subtyp ayw
pGEM ayw N248H	pGEM-T-Easy mit Mutation an der Aminosäureposition 248 im Polymerasegen Genotyp D, Subtyp ayw
pHBV ayw N248H	HBV-Plasmid mit Mutation an der Aminosäureposition 248 im Polymerasegen, Genotyp D, Subtyp ayw

2.8.1.2 Ligation

Um das gewünschte DNA-Fragment in den entsprechenden Zielvektor zu ligieren, wurden die Fragmente und Vektoren mit den gleichen Restriktionsenzymen (*EcoRI* und *NcoI*) geschnitten und über eine Agarose-Gelextraktion aufgereinigt. Für die Ligation wurden die Polymerasefragmente und die Vektor-DNA im molaren Verhältnis 3:1 (Insert zu Vektor) gemischt und zusammen mit der Ligase, T4-DNA-Ligase (Promega), und dem Promega-Ligase Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert, gefolgt von einer Elektrotransformation der *E.coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz.

2.8.1.3 Herstellung elektrokompentener Bakterien

Um elektrokompente Bakterien zu gewinnen, wurden 1000 ml LB-Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur (Kap. 2.8.1.5) des gewünschten Bakterienstamms HB101 beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,5-0,6 inkubiert. Nach dem Abkühlen der Kultur für 50 min auf Eis im Kühlraum wurde die Kultur pelletiert (15 min bei 6000 x g). Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem ddH₂O und anschließend mit kaltem 10 % Glycerin gewaschen. Das Pellet dieses Waschschrittes wurde in 2 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen, á 50 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.8.1.4 Elektrotransformation

Um Plasmid-DNA in Bakterien einzuschleusen, erfolgte eine Elektrotransformation. Für die Elektrotransformation der *E.coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz wurde 1 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl elektrokompenter Bakterien (Kap. 2.8.1.3) gegeben und diese Mischung anschließend in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette bei 1,8 kV, 200 Ω, 25 µF transformiert. Nach dem Elektroschock wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium (Kap. 2.1.3) aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde daraufhin 30 Sekunden bei 2500 x g abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die Zellen im Restmedium (ca. 150 µl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert, wobei die transformierten Bakterien Bakterienkolonien ausbilden.

2.8.1.5 Plasmid-DNA-Präparation

Bei der Plasmid-DNA Präparation wurde Plasmid-DNA aus einer Bakterienübernachtkultur wie im Folgenden beschrieben isoliert um Plasmid-DNA frei von RNA oder chromosomaler DNA aus den Bakterien zu isolieren. Diese stand danach für die weiteren Verfahren wie Restriktionsenzymverdau, PCR oder Sequenzierung zur Verfügung. Die unterschiedlichen Präparationsmethoden unterscheiden sich in ihrer Ausbeute und Reinheit der gewonnen Plasmid-DNA.

Bakterienübernachtkultur

Für eine Übernachtkultur wurde LB-Selektionsmedium (Kap. 2.1.3) mit Bakterien eines Bakterien-Glycerinstocks oder mit Bakterien einer Bakterienkolonie einer LB-Amp-Agarplatte angeimpft. Als Selektionsantibiotikum wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Maxipräparation

Für die Präparation größerer Mengen an reiner Plasmid-DNA wurde der *NucleoBond PC 500 Kit* (Macherey Nagel) benutzt. 100 ml Bakterienübernachtskultur dienten als Ausgangsmaterial und wurden bei 4 °C für 15 Minuten mit 6.000 x g zentrifugiert. Nach der alkalischen Zellyse und der Aufreinigung über die Säule erfolgte eine Isopropanolfällung, um die DNA zu präzipitieren. Anschließend wurde das Pellet nach dem Trocknen in ca. 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen. Um die Konzentration und die Reinheit der erhaltenen DNA zu bestimmen, wurde die Absorption der DNA bei 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen.

Minipräparation

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA diente 1 ml einer 4 ml Übernachtskultur. Die Bakteriensuspension wurde bei 8.000 rpm für eine Minute abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet alkalisch lysiert. Dafür wurde das Pellet zuerst in 200 µl des RNase-haltigen Resuspensionspuffers S1 aus dem *NucleoBond PC 500 Kit* resuspendiert, anschließend mit 200 µl des Puffers S2 alkalisch lysiert, gefolgt von einer Neutralisation mit 200 µl des Puffers S3. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurden in einer 10minütigen Zentrifugation die Zelltrümmer vom Überstand getrennt. Aus dem Überstand wurde anschließend mit einer Isopropanolfällung die Plasmid-DNA gefällt, das DNA-haltige Pellet getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

2.8.1.6 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde für analytische und präparative Zwecke eingesetzt. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,1-0,2 µg DNA, für präparative Anwendungen 3 µg DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Die verwendeten Enzymmengen betragen 1-5 IU/µg DNA. Inkubationspuffer, -zeit und -temperatur sind je nach Enzym unterschiedlich und wurden der

Enzymaktivitätsliste des Herstellers (New England Biolabs) entnommen. Die Aktivität der Restriktionsenzyme wurde jeweils durch Erhitzen auf eine Temperatur entsprechend den Herstellerangaben gestoppt. Der analytische Verdau diente zur Überprüfung der Klonierung. Es wurden die gleichen Restriktionsenzyme wie bei der Klonierung (*EcoRI* und *NcoI*) eingesetzt, um zu prüfen, ob das Insert im Vektor enthalten war (Kap. 2.8.1).

2.8.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger, Nicklen et al. 1977). Dazu wurden die zu sequenzierenden Plasmide in einer Sequenzierungs-PCR-Reaktion amplifiziert. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 200 ng DNA, 10 pmol Primer (Tab. 5), 2 µl *BigDye Terminator Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems) und wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte nach dem Protokoll in Tab. 8. Nach der Sequenzierungs-PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte durch eine Ethanol-Fällung gereinigt, getrocknet und in 20 µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen. Anschließend wurden sie mit dem ABI PRISM 310-Kapillarsequenzierer analysiert.

Tab. 8: PCR-Protokoll der Sequenzierungs-PCR

Einmalig	96 °C	4 min
25 Zyklen	95 °C	15 sec
	50 °C	15 sec
	60 °C	75 sec

2.8.1.8 Agarose-Gelelektrophorese Experimente

In Agarose-Gelelektrophorese Experimenten wurden DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch das Interkalanz Ethidiumbromid wurden sie nach Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Verschiedene Agarosekonzentrationen des Gels trennen die DNA-Fragmentlängen

unterschiedlich auf. Ein 1%iges Gel hat einen Trennbereich von 0,5 bis 10 kb, ein 2%iges Gel trennt Fragmente von 0,1 bis 2 kb.

Die Agarose wurde in TAE-Puffer (Kap. 2.1.1) aufgekocht und nach Ethidiumbromidzugabe von 0,5 µg/ml (Kap. 2.1.1) in den Gelschlitten gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und mit Ladepuffer versetzten Proben beladen (6xloading dye, Fermentas). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 90 V für 45 bis 60 Minuten, wobei die Größe der darzustellenden DNA-Fragmente anschließend mit einem DNA-Standard abgeglichen wurde. Für 1%ige Gele wurde *Lambda-puC Mix Marker 4*, für 2%ige Gele *Lambda-puC Mix Marker 8* verwendet (beide Fermentas).

2.8.1.9 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese mussten die DNA-Fragmente für die Weiterverarbeitung teilweise aus dem Gel isoliert werden. Dazu wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Beleuchtung aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und anschließend nach dem Protokoll des *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey Nagel) aufgereinigt.

2.8.2 Zellkultur

2.8.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Hepatomzellen der humanen Hepatomzelllinie HuH-7 (Nakabayashi, Taketa et al. 1984) wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in DMEM-Nährmedium mit 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination (Kap. 2.1.2) kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die konfluent gewachsenen Zellen vereinzelt. Dazu wurden die Zellen mit 2,5 ml 1xPBS gewaschen und für ungefähr drei Minuten mit 2 ml 1xTrypsin-EDTA inkubiert, welches danach

durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium inaktiviert wurde. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 in neuen Kulturflaschen ausgesät.

Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer ausgezählt und mit der Zielzellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 2 cm in einem Endvolumen von 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubation von ungefähr 24 Stunden und dem Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen transfiziert.

2.8.2.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Die transiente Transfektion der HuH-7 Zellen mit HBV-Plasmiden erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode nach Wigler (Wigler, Silverstein et al. 1977). Die Gesamtmenge des Transfektionsansatzes betrug 10 % des Mediumvolumens in der Zellkulturschale. Der Ansatz setzte sich aus 50 % Phosphat-BES (280 mM NaCl, 50 mM BES pH 6,25, 0,75 mM Na_2HPO_4 , 0,75 mM NaH_2PO_4), 25 % Calcium-BES (0,5 M CaCl_2 , 0,1 M BES pH 6,95) und 25 % DNA in sterilem Ampuwa-Wasser zusammen. Jede Zellkulturschale wurde mit 5 μg DNA transfiziert. Damit die DNA Präzipitate mit Calcium und Phosphat ausbilden konnte, wurde sie zuerst für 15 Minuten in dem Calcium-BES Puffer bei Raumtemperatur und nach Zugabe des Phosphat-BES Puffers für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in die Zellkulturschale pipettiert. Da es sich in dieser Arbeit um replikationsfähige HBV-Plasmide handelte, wurden die Kulturschalen nach der Transfektion im S2 Labor weiterkultiviert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.8.2.3 Kultivierung der Zellen unter Einfluß des Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil

24 Stunden nach der Transfektion wurde das Nährmedium gewechselt. Zusätzlich zu dem neuen Nährmedium wurde das antivirale Medikament Adefovir dipivoxil (ADV) mit einer Endkonzentration von jeweils 1 μM , 5 μM ,

10 μM und 20 μM zugegeben. Der Mediumswechsel wurde nach 48 Stunden wiederholt, wobei wiederum ADV in den gleichen Endkonzentrationen zugegeben wurde. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

2.8.2.4 Zellernte

Bei der Zellernte wurde zuerst der Mediumüberstand abgenommen und für die Weiterverarbeitung gesammelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 1xPBS-Puffer gewaschen und drei Minuten mit 2 ml 1xTrypsin-EDTA inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Das Trypsin wurde mit 1 ml DMEM-Medium inaktiviert und die Zellen in diesem Medium resuspendiert. Um die Zellen aus dem Zellkulturmedium zu isolieren, wurde die Lösung 5 Minuten bei 1000xg zentrifugiert und das entstandene Zellpellet daraufhin durch zweimaliges Waschen mit 500 μl PBS-Puffer von den Mediumsresten gereinigt.

2.8.2.5 Isolation der Virus-Kapside

HBV-Virus-Kapsid-Fällung aus dem Zellkulturmediumüberstand mit einer Polyethylenglykol-(PEG-)Fällung

Mit der PEG-Fällung wurden die ins Nährmedium sezernierten Viruskapside isoliert. Die Viruskapside assoziieren unspezifisch mit Polyethylenglykol und können so extrahiert werden. Der bei der Zellernte abgezogene Mediumüberstand des Zellkulturansatzes (Kap. 2.8.2.4) wurde für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden 1,5 ml des Mediumüberstands für die Fällung mit Endkonzentrationen von 0,4 M NaCl und 25 mM EDTA versetzt, 166 μl 10xPEG-Lösung (85 % PEG 6000 w/v ddH₂O) zugegeben und bei 4 °C über Nacht im Überkopffrotator inkubiert. Die mit PEG assoziierten Kapside wurden nach der Inkubation durch eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 13000 rpm aus der Lösung gefällt.

Isolation intrazellulärer HBV-Kapside mit Immunpräzipitation

Materialien für die Immunpräzipitation

Protein-A-Agarose (Roche)

TNE-Puffer 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl

Lysepuffer 10 mM Tris pH 8; 10 mM NH₄Cl; 1 mM EDTA pH 8; 10 mM MgCl₂; 0,1 % 2-Mercaptoethanol (Sigma); 0,2 % Igepal (Sigma); 1 mM Dithiotreitol (DTT) (Sigma); 1 mM Pefablock (Roche)

Immunpräzipitation

Für die selektive Isolation der intrazellulären Kapside wurde eine HBcAg-spezifische Immunpräzipitation durchgeführt. Als Antikörper diente ein polyklonaler Antikörper gegen das HBV-Core-Protein (Kaninchen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg). Zur Lyse der Zellen wurden die nach der Zellernte (Kap. 2.8.2.4) erhaltenen Zellpellets für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Lysepuffer für die Immunpräzipitation (s.o.) inkubiert und danach homogenisiert.

Vor der eigentlichen Immunpräzipitation erfolgten parallel zwei Präinkubationen: Zum einen eine Präinkubation des Zelllysats mit Protein-A-Agarose, um unspezifische Bindungen zwischen Bestandteilen des Zelllysats und der Protein-A-Agarose zu fällen, zum anderen eine Präinkubation der Protein-A-Agarose mit den Anti-HBc-Antikörpern, um diese an die Protein-A-Agarose zu binden. In einem ersten Schritt wurde die Protein-A-Agarose für beide Präinkubationen vorbereitet. Dafür wurden 150 µl Protein-A-Agarose pro Probe zweimal mit jeweils 200 µl TNE gewaschen und dann in 200 µl TNE aufgenommen.

Für die Präinkubation des Zelllysats wurde dieses in 100 µl gewaschener Protein-A-Agarose aufgenommen und darin 6-8 Stunden bei 4 °C im Überkoprotator inkubiert, um danach in einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 12000 rpm die unspezifischen Bindungen zu fällen. Der Überstand wurde

vorsichtig für die folgende Immunpräzipitation abgenommen, das Pellet verworfen.

Für die Bindung der Antikörper an die Protein-A-Agarose wurden 15 µl des Anti-HBc-Antikörpers für 6-8 Stunden bei 4°C im Überkopffrotator mit den restlichen 100 µl der gewaschenen Protein-A-Agarose (s.o.) präinkubiert.

Auf die Präinkubationen folgte die Immunpräzipitation, bei der die HBV-Core-Antikörper spezifisch die HBV-Kapside binden sollen. Dazu wurde zu der präinkubierten antikörpergekoppelten Protein-A-Agarose der Überstand des vorbehandelten Zelllysats gegeben. Die Immunpräzipitation erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C im Überkopffrotator. Die Präzipitate wurden nach der Inkubation durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 rpm gefällt. Um reine Pellets zu erhalten, wurden diese abschließend zweimal mit TNE-Puffer gewaschen.

DNase- und RNase-Verdau

Um die extrakapsidäre DNA (transfizierte DNA) und RNA aus den immunpräzipitierten, gewaschenen Pellets zu entfernen, wurden diese mit DNase und RNase verdaut. Die Pellets (ungefähr 40 µl) wurden dafür mit 4 µl 10fach DNase-Puffer (Roche) versetzt und mit 5 µl DNase-I (20 IU/µl) (Roche) und 1,5 µl RNase (10 mg/ml) eineinhalb Stunden bei 37 °C verdaut. Zur Inaktivierung der DNase wurde das Gemisch für 10 Minuten auf 75 °C erhitzt und EDTA mit einer Endkonzentration von 10 mM und SDS mit einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben.

Proteinase K-Verdau

Für die Freisetzung der HBV-DNA aus den HBV-Kapsiden wurden die immunpräzipitierten HBV-Kapside nach dem DNase-Verdau mit Proteinase K verdaut. Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit jeweils 300 µl TNE-Puffer in 200 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 1 % SDS)

gelöst und mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) (Qiagen) versetzt. Für den Verdau wurde das Gemisch zwei Stunden bei 56 °C im Thermomixer inkubiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die sich an den Proteinase K-Verdau anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung diente dazu die DNA aus der Lösung zu fällen und dadurch zu konzentrieren. Da sich die DNA bei der Phenol-Chloroform-Extraktion in der wässrigen Phase löst, kann sie in dieser abgezogen werden.

Im ersten Schritt wurde die DNA-Lösung mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol von ca. 210 µl (25:24:1) (Roth) ausgeschüttelt. Nach Vortexen des Gemischs für 20 Sekunden wurde es für die Phasentrennung 10 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde anschließend abpipettiert und die phenolhaltige Unterphase mit gleichem Volumen bidestillierten Wassers von ca. 200 µl versetzt, um die darin verbliebene DNA zu fällen. Dazu wurde die Probe wie oben beschrieben gevortext und zentrifugiert. Die in diesem Schritt entstandene wässrige Oberphase wurde zu der im ersten Schritt abgenommenen gegeben. In einem dritten Schritt erfolgte die Reinigung der wässrigen Oberphasen aus Schritt eins und zwei mit gleichem Volumen (ca. 400 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (Roth). Für die Phasentrennung wurde nach Vortexen für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und die entstandene wässrige Oberphase als Endprodukt abgenommen.

Isopropanolfällung

Um die DNA weiter zu konzentrieren und von den Phenolresten zu reinigen, wurde sie mit Isopropanol gefällt. Alle Schritte der Isopropanolfällung erfolgten bei Raumtemperatur. Zu den 400 µl der DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen (400 µl) Isopropanol gegeben, für 45 Minuten inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol

gewaschen. Der Überstand dieses Ethanol-Waschschriffs wurde wiederum vorsichtig dekantiert, das DNA-Pellet daraufhin getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

2.8.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In vorliegender Arbeit wurde eine PCR-Reaktion unter anderem für die Sequenzierung der durch Mutagenese generierten Konstrukte (Kap. 2.8.1) verwendet, um die mutierte Genregion für eine Sequenzierung (Kap. 2.8.1.7) zu amplifizieren. Dafür wurden 200 ng Plasmid-DNA in eine PCR-Reaktion mit Primern speziell für den entsprechenden mutierten Bereich eingesetzt (Primer Tab. 5).

Ein PCR-Ansatz von 25 µl setzte sich zusammen aus 0,5 µl dNTPs (25mM), 1 µl Vorwärts-und 1 µl Rückwärtsprimer (10 pmol/µl), 2,5 µl 10xPuffer, 0,5 µl Taq-Polymerase und 200 ng Plasmid-DNA. Ein 25 µl PCR-Ansatz wurde auf 25 µl ddH₂O aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach unten stehendem Protokoll (Tab. 9).

PCR-Reaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter in nested-PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.2.7), Reverse Transkriptase-PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.2.10) und quantitative real time TaqMan-PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.2.8) durchgeführt.

Tab. 9: PCR-Protokoll der Klonierungs-PCR

1 Zyklus	95 °C	3 min
25 Zyklen	95 °C	30 sec
	50 °C	30 sec
	72 °C	40 sec
1 Zyklus	72 °C	3 min

2.8.2.7 Nested-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nested-PCR für die Detektion der HBV-DNA aus dem EDTA-Blut der Patientenproben sowie für die semiquantitative

Bestimmung der HBV-DNA der Zellkulturansätzen nach der PEG-Fällung (Kap. 2.8.2.5) eingesetzt. Dafür wurden als Template 5 µl einer ersten PCR-Reaktion in eine zweite PCR-Reaktion mit jeweils spezifischen Primern für das S-Gen eingesetzt (Primer Tab. 3). Das Primerpaar der zweiten PCR-Reaktion liegt dabei zwischen dem der ersten PCR-Reaktion. Die Ansätze der PCR-Reaktionen entsprachen denen der gewöhnlichen PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.2.6). Für die Reaktion wurden nachfolgende Protokolle verwendet (Tab. 10, Tab. 11).

Tab. 10: Erste PCR-Reaktion der nested-PCR

35 Zyklen	94 °C	30 sec
	50 °C	30 sec
	72 °C	45 sec

Tab. 11: Zweite PCR-Reaktion der nested-PCR

40 Zyklen	94 °C	30 sec
	50 °C	30 sec
	72 °C	45 sec

2.8.2.8 Quantitative PCR

Die absolute HBV-DNA-Menge der aus den Zellkulturansätzen isolierten DNA (Kap. 2.8.2.5) wurde in einer quantitativen TaqMan®-PCR gemessen. Dazu wurden 2,5 µl DNA-Lösung der Zellkulturansätze mit 12,5 µl *TaqMan® Universal Mastermix* (Applied Biosystems), 1 µl des Vorwärts- und 1 µl des Rückwärtsprimer (Primer Tab. 6), 1 µl Probe (Probe Tab. 6) und 7 µl ddH₂O versetzt. Die PCR-Reaktion und Detektion der Fluoreszenz erfolgte im 7300 Real Time PCR System der Firma Applied Biosystems nach dem Protokoll in Tab. 12. Der Amplifikationsbereich dieser HBV-TaqMan®-PCR liegt im Core-Gen des HBV-Genoms.

Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgte in dieser Arbeit absolut, wofür die HBV-DNA Kopienzahl an Hand einer Standardkurve kalkuliert wurde. Die Standardkurve wurde über die Vermessung der Schwellenwerte (Threshold Cycle-(Ct-)Werte) einer Verdünnungsreihe von 10 pg bis 1 fg des Plasmids

pHBV adw2 1,28 mit bekannter Ausgangskonzentration und bekannter HBV-Genom-Kopienzahl erstellt. Bei einer Genomgröße von ca. 3,2 kbp des HBV-Genoms entsprechen 10 pg etwa $2,8 \times 10^6$ Kopien. Der Ct-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen.

Tab. 12: PCR-Protokoll der TaqMan®-PCR

1 Zyklus	95 °C	10 min
45 Zyklen	95 °C	15 sec
	60 °C	1 min

2.8.2.9 RNA-Isolation

Um die Hepatitis B-Virusreplikation zusätzlich auf RNA-Ebene nachzuweisen, wurde aus einem Zellkulturansatz mit HBV-transfizierten HuH-7-Zellen die zelluläre Gesamt-RNA unter Verwendung des Kits *NucleoSpin RNA II* (Macherey Nagel) isoliert. Das Herstellerprotokoll wurde mit leichten Modifikationen durchgeführt wie die Verlängerung des DNase-Verdaus auf der Säule von 15 Minuten auf 30 Minuten. Um mit Sicherheit alle DNA verdaut zu haben, wurde außerdem ein zusätzlicher DNase Verdau angeschlossen. Die Probe wurde dafür mit 6 µl DNase Puffer (Roche) und 2 µl DNase-I (Roche) versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten verdaut. Die DNase wurde anschließend durch zehnmütiges Erhitzen bei 75 °C inaktiviert. Die Menge der am Ende eluierten RNA wurde photometrisch bestimmt.

2.8.2.10 One-Step Reverse Transkriptase (RT-) -PCR

Zum Nachweis der RNA wurde eine Reverse Transkriptase-PCR durchgeführt. Dafür wurde das *One-Step RT-PCR Kit* von Qiagen verwendet, mit dem RNA in einem Schritt in DNA umgeschrieben und amplifiziert wird. Für die semiquantitative RT-PCR wurde 1 µg der RNA mit den für das S-Gen spezifischen Primern (Tab. 3) revers transkribiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte nach dem Protokoll in Tab. 13.

Tab. 13: PCR-Protokoll der One-Step RT-PCR

Einmalig	50 °C	30 min
	95 °C	15 min
35 Zyklen	94 °C	30 sec
	50 °C	30 sec
	72°C	45 sec
Einmalig	72°C	5 min

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Selektion und das Vorkommen von Resistenzmutationen in der reversen Transkriptase-(RT-)Domäne des Hepatitis B Virus gegenüber der antiviralen Therapie der chronischen HBV-Infektion mit Nukleos(tid)analoga, insbesondere dem Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil (ADV) genotypisch und phänotypisch untersucht und charakterisiert. Zur genotypischen Analyse wurden Genotypisierungs- und Sequenzierungsergebnisse sowie weitere virale Parameter von 276 Patientenproben retrospektiv in anonymisierter Form analysiert und ausgewertet. Nach Auskunft der Ethikkommission der Universität Tübingen (Prof. Dr. Luft) ist im vorliegenden Fall kein spezielles Ethikvotum notwendig, da es sich um eine retrospektive vollständig anonymisierte Arbeit im Sinne einer historischen Studie handelt. Die in diesen Analysen neu identifizierten spezifischen Resistenzmutationen wurden phänotypisch funktionell in Zellkulturexperimenten auf ihr Ansprechen gegenüber ADV analysiert (Kap. 2.8). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, wie die Identifikation neuer Resistenzmutationen haben für das Management der weiteren antiviralen Therapie der chronischen HBV-Infektion weitreichende Konsequenzen.

3.1 Genotypische Analyse der Selektion von Resistenzmutationen

Für die Untersuchungen zur Selektion und der Häufigkeit des Vorkommens von HBV-Polymerasegenmutationen gegenüber der antiviralen Therapie mit Nukleos(tid)analoga wurden von 276 Patientenseren chronisch HBV-infizierter Patienten retrospektiv und anonymisiert virale, serologische und klinische Parameter ermittelt, wozu mit dem Nukleotidanalogue Adefovir dipivoxil (ADV) (Handelsname, Hepsera®) behandelte Patienten bevorzugt ausgewählt wurden. ADV ist ein seit 2003 in Deutschland zugelassenes Nukleotidanalogue mit

hoher antiviraler Aktivität im Vergleich zu dem bislang am häufigsten eingesetzten Nukleosid analog Lamivudin (Zeffix®). Bislang sind zwei Resistenzmutationen rtN236T und A181V/T im HBV-Polymerasegen gegenüber einer ADV-Therapie in der Literatur beschrieben (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Auffallend war im Therapieverlauf der Patienten ein schlechtes oder kein Ansprechen gegenüber der antiviralen Therapie mit ADV. Ziel der hier vorliegenden Untersuchungen war es potentielle neue Resistenzmutationen im HBV-Polymerasegen zu identifizieren und anschließend funktionell zu charakterisieren, um deren Phänotyp gegenüber der ADV-Therapie zu ermitteln.

Die Erhebung der virologischen Daten der 276 Patientenproben wurden durch eigene Arbeit und mit Unterstützung der molekularpathologischen Diagnostik der Abteilung für molekulare Pathologie durchgeführt. Die serologischen und klinischen Angaben wurden aus anonymisierten Arztberichten der überweisenden Ärzte eruiert.

3.1.1 Angaben zu den anonymisierten Patientendaten

Insgesamt wurden 276 Patientenproben untersucht. Das Alter der Patienten lag bei 13-80 Jahre, mit einem Mittelwert von 42 (+/- 14) Jahren. Im Mittel wurde 18 (+/- 13) Monate mit ADV behandelt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten zeigte sich innerhalb dieser Zeit ein schlechtes oder kein Ansprechen auf die Therapie (Tab. 14).

Da sich eine Therapieresistenz durch Analysen der klinischen und virologischen Parameter feststellen lässt, wurde die Viruslast und der Transaminasewert der Alaninaminotransferase (ALT) bestimmt, um das Therapieversagen analysieren zu können. Die Viruslast wurde nach einer HBV-DNA Extraktion aus Patienten EDTA-Blut mit einer TaqMan®-PCR bestimmt. Die HBV-DNA lag im Mittel bei $2,2 \cdot 10^8$ Kopien/ml, mit einer Spannweite von $290-4 \cdot 10^9$ Kopien/ml. Die Verteilung der Viruslast zeigt Fehler: Referenz nicht gefunden. Bei 15/276 Patienten lag der HBV-DNA Wert unter dem Schwellenwert einer virologisch

relevanten Resistenz von 10^4 Kopien/ml, bei allen anderen behandelten Patienten darüber. Ein unzureichendes Therapieansprechen zeigte sich in einer Viruslastabnahme von weniger als 0,6 logarithmischen Stufen im Durchschnitt, die aus der Viruslast vor und nach der Therapie berechnet wurde, wobei Therapieansprechen als eine Abnahme der Viruslast um mindestens eine logarithmische Stufe innerhalb von drei Monaten definiert wurde (Tab. 14).

Der Transaminasewert ALT (Normwert: 35 IU/l) zeigt zudem eine klinisch relevante Resistenz an (Kap. 1.3.2.1). 232/276 (84 %) analysierte Patientenproben standen dafür zur Auswertung zur Verfügung, wobei der ALT-Wert im Mittel bei 141 IU/l (\pm 284 IU/l) lag, mit einer Spannweite von 7-2500 IU/l. Bei 43/232 (19 %) lag der ALT-Wert im Normbereich, bei 54/232 (23 %) war er erhöht und bei 96/232 (41 %) mit über 70 IU/ml, dem Doppelten des Normwerts, deutlich erhöht (Tab. 14). Somit zeigten bis auf 43/232 (19 %) Patienten alle definitionsgemäß eine klinische Resistenz gegenüber einer Behandlung mit ADV.

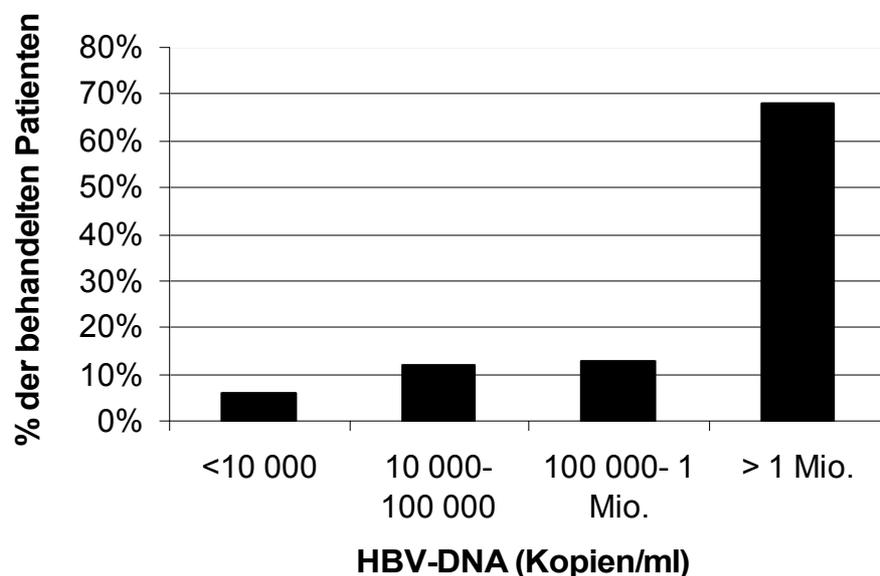


Abb. 13: Verteilung der Viruslast der behandelten Patienten, 10 000 Kopien/ml stellen den Schwellenwert einer virologisch relevanten Resistenz dar.

Tab. 14: Klinische und virologische Parameter der anonymisierten Patientendaten:

* Durchschnittliches Alter der untersuchten Patienten, in Jahren mit +/- Standardabweichung (SD)

\$ Durchschnittliche Therapiedauer mit Adefovir Monotherapie in Monaten mit +/- SD

Alaninaminotransferase (ALT) unterhalb des Normwerts von 35 IU/l, gemessen bei 232 Patienten

§ Alaninaminotransferase (ALT) oberhalb des Normwerts von 35 IU/l, aber geringer als das Doppelte der Norm mit 70 IU/l, gemessen bei 232 Patienten

¶ Alaninaminotransferase (ALT) oberhalb des Doppelten der Norm, gemessen bei 232 Patienten

** Durchschnittliche Viruslast vor Therapiebeginn und nach Therapieende der Adefovir Monotherapie

\$\$ Durchschnittliche Veränderung der Viruslast unter der Adefovir Monotherapie, angegeben als logarithmische Stufe

Mittleres Alter (Jahre, +/- SD) *	42 (+/- 14)
Mittlere Therapiedauer (Monate, +/- SD) \$	18 (+/- 13)
ALT (IU/l) <35 (n=232) #	43/232 (19 %)
ALT (IU/l) >35 <70 (n= 232) §	54/232 (23 %)
ALT (IU/l) >70 (n= 232) ¶	96/232 (41 %)
Viruslast vor Therapie (Kopien/ml) **	$7,0 \cdot 10^8$
Viruslast nach Therapie (Kopien/ml) **	$2,2 \cdot 10^7$
Veränderung der Viruslast während Therapie \$\$	-0,6 log

Zum Zeitpunkt der durchgeführten genotypischen Untersuchung wurden alle hier analysierten Patienten mit ADV behandelt. Ein eventueller Einfluss einer vorangegangenen IFN- α Therapie oder einer früheren oder bestehenden

Lamivudinresistenz auf die ADV-Therapie und die Selektion von Resistenzmutationen sollte zunächst untersucht werden. Über eine IFN- α Vortherapie lagen bei 55/276 (20 %) Patienten Angaben vor, wobei 53/55 (96 %) eine IFN- α -Vorbehandlung erhalten hatten, 2/53 (4 %) jedoch nicht (Tab. 15). Bei 119/276 (43 %) Patienten standen Daten über eine frühere Lamivudinresistenz zur Auswertung zur Verfügung. Eine frühere Lamivudinresistenz war bei 109/119 (92 %) Patienten identifiziert worden, bei 10/119 (8 %) konnte diese ausgeschlossen werden. Um eine aktuelle genotypische Lamivudinresistenz aufzudecken, wurde die Genomsequenz auf die bislang publizierten Lamivudinresistenzen rtM204I/V/S im katalytischen Zentrum der HBV-reversen Transkriptase, dem sogenannten YMDD-Motiv (Kap. 1.1.2.3), die Mutation rtL180M in der B-Domäne sowie die potentielle Lamivudinresistenzmutation rtC256S untersucht (Allen, Deslauriers et al. 1998; Lai, Dienstag et al. 2003). 58/276 (21 %) Patienten zeigten eine aktuelle genotypische Lamivudinresistenz. 28/276 (10 %) Patienten zeigten die Mutation rtM204V (YVDD) in Kombination mit der Mutation rtL180M in der B-Domäne. Eine isolierte YMDD-Mutation (YIDD) war in 9/276 (3 %) Fällen, die Mutation rtL180M isoliert in 4/276 (1,4 %) Fällen festzustellen. Die Lamivudinresistenzmutation rtC256S wurde in 15/276 (5 %) nachgewiesen. Gemeinsam traten alle drei Mutationen 2/276 (0,7 %) auf (Tab. 15).

Tab. 15: Vorbehandlung der Patienten: Bei 55/276 (20 %) lagen Angaben zu einer Interferon- α (IFN- α -) Vorbehandlung vor: 53/55 (96 %) wurden mit INF vorbehandelt, 2/55 (4 %) nicht. Angaben zu einer früheren Lamivudinresistenz lagen bei 119/276 (43 %) vor, wovon 109/119 (92 %) eine frühere Lamivudinresistenz zeigten.

Bei 58/276 (21 %) konnten bekannte Lamivudinresistenzen nachgewiesen werden, welche an entsprechend in der Literatur beschriebenen Positionen im HBV-Polymerasegen vorgefunden wurden (YMDD-Motiv der HBV-reversen-Transkriptase, rtL180M in der B-Domäne der reversen Transkriptase und an Position rtC256S, jeweils einzeln oder in Kombination).

Angaben zur IFN- α -Vorbehandlung	INF- α -	Kein INF- α -	Angaben zu früheren Lamivudinresistenz	Frühere Lamivudinresistenz	Keine frühere Lamivudinresistenz
55/276 (20 %)	53/55 (96 %)	2/55 (4 %)	119/276 (43 %)	109/119 (92 %)	10/119 (8 %)

Aktuelle Lamivudinresistenz					
gesamt	YMDD	rtL180M	YMDD +rtL180M	rtC256S	YMDD +rtL180M +rtC256S
58/276 (21 %)	9/276 (3 %)	4/276 (1,4 %)	28/276 (10 %)	15/276 (5 %)	2/276 (0,7 %)

Um zwischen einer HBeAg-positiven und HBeAg-negativen chronisch aktiven HBV-Infektion unterscheiden zu können und einen potentiellen Unterschied dieser zwei Formen der chronisch aktiven HBV-Infektion aufzuzeigen, wurde der HBeAg-Status und der anti-HBe-Status der Patienten den Angaben der Arztberichte der überweisenden Ärzte entnommen. Die serologischen Daten zeigten in der Gesamtgruppe 137/204 (67 %) HBeAg-positiv und 67/204 (33

%) HBeAg-negative HBV-Infektionen, bei 72/276 (26 %) Patienten konnte der HBeAg-Status nicht eruiert werden. Der anti-HBe-Status lag bei 189/276 (86 %) zur Auswertung vor, wobei 86/189 (46 %) der Patienten einen positiven und 103/189 (54 %) einen negativen anti-HBe-Status zeigten (Tab. 16). Die Differenzen zwischen HBeAg und anti-HBe gründen vermutlich in unterschiedlichen Stadien der Krankheitsverläufe.

Tab. 16: Serologische Parameter der HBV-infizierten Patienten: Der HBeAg-Status war bei 204/276 (74 %) Patienten bekannt, bei 137/204 (67 %) positiv, bei 67/204 (33 %) negativ. Der anti-HBe-Status von 189/276 (68 %) Patienten war bei 86/189 (46 %) positiv, bei 103/189 (54 %) negativ (nach Angaben der Arztberichte der überweisenden Ärzte).

HBeAg positiv	HBeAg negativ	anti-HBe positiv	anti-HBe negativ
137/204 (67 %)	67/204 (33 %)	86/189 (46 %)	103/189 (54 %)

3.1.2 Analyse der HBV-Genotypverteilung

Das Hepatitis B Virus lässt sich in acht Genotypen (A-H) einteilen. Der HBV-Genotyp A ist in den USA und in Nord- und Mitteleuropa am weitesten verbreitet. Der HBV-Genotyp D ist in Südeuropa, im Mittleren Osten und in Indien am häufigsten anzutreffen. Die HBV-Genotypen B und C haben die höchste Prävalenz in Asien (Liu, Kao et al. 2005). Es wurde ein genotypabhängiges Therapieansprechen unter IFN- α und Lamivudintherapie beschrieben, wobei IFN- α besser auf den HBV-Genotyp A im Vergleich zu D und HBV-Genotyp B im Vergleich zu C anspricht (Erhardt et al., 2005; Wai et al., 2002). Für Lamivudin wurde bei HBV-Genotyp A im Vergleich zu D eine höhere Rate an Resistenzentwicklung gezeigt (Zollner et al., 2004) (Kap. 1.1.4), während für ADV bislang keine Unterschiede bekannt sind. Um die Prävalenzen der verschiedenen HBV-Genotypen innerhalb des vorliegenden Patientenkollektivs zu bestimmen und einen eventuellen Einfluss der HBV-Genotypen auf die Resistenzentwicklung gegenüber der ADV-Therapie zu

untersuchen, wurden die Patientenproben genotypisiert und die HBV-Genotypen mit ihrem Ansprechen gegenüber einer ADV-Therapie korreliert. Für die Genotypisierung wurde die HBV-DNA aus dem Patienten EDTA-Blut isoliert und nach einer Amplifikation mit einer nested-PCR sequenziert (Kap. 2.8.1.7). Der Genotyp der erhaltenen viralen Sequenz wurde durch einen Sequenzabgleich mit der Gendatenbank NCBI NHI bestimmt (Kap.2.7).

Nach Abgleich mit der Datenbank zeigte Genotyp D mit 56 % die höchste Prävalenz, Genotyp A machte 25 % der Grundgesamtheit aus, darauf folgten Genotyp B mit 8 % und Genotyp C mit 4 %, wobei Genotyp G mit nur 1 % den geringsten Anteil ausmachte. Die HBV-Genotypen F und H waren nicht nachzuweisen (Abb. 14). Als mögliche Ursache für die hohe Prävalenz des Genotyps D im Patientenkollektiv dieser Studie, wobei eigentlich der Genotyp A in Nord- und Mitteleuropa am häufigsten erwartet wird, lässt sich mit einem möglichen Migrationshintergrund vieler Patienten aus Südeuropa und dem mittleren Osten erklären.

Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der verschiedenen HBV-Genotypen mit dem Ansprechen gegenüber einer antiviralen Therapie mit ADV erfolgte mit einem Chi²-Test, wobei jeweils die einzelnen Mutationen mit den vier häufigsten HBV-Genotypen A, B, C und D geprüft wurden. Die statistischen Analysen ergaben keinen Zusammenhang der selektierten und vorkommenden Mutationen im HBV-Polymerasegen mit den verschiedenen HBV-Genotypen im untersuchten Patientenkollektiv.

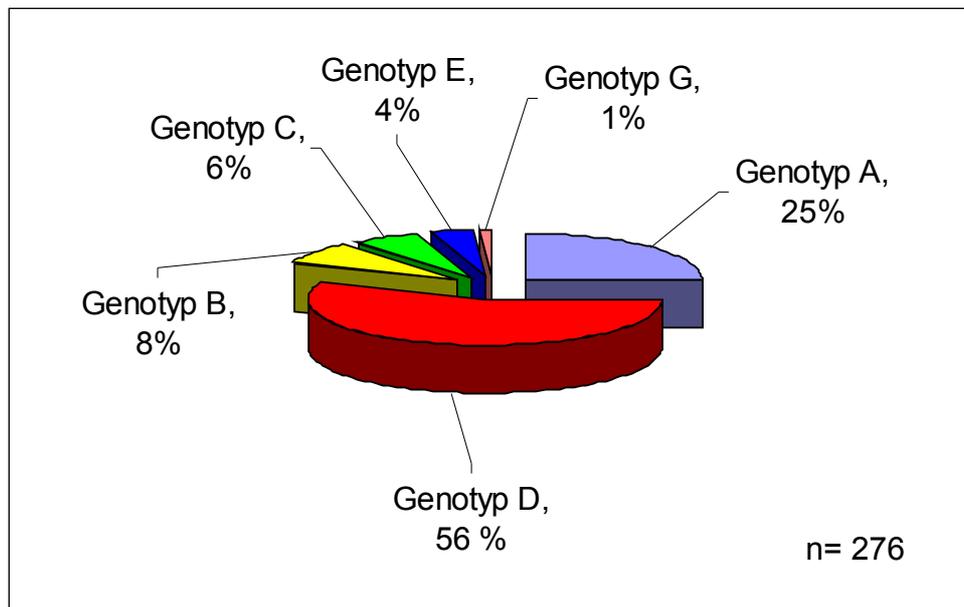


Abb. 14: Verteilung der Genotypen der Serumproben 276 HBV-infizierter Patienten. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten.

3.1.3 Genotypische Analyse der HBV-reverse Transkriptase-Domäne von Patienten mit Therapieversagen unter ADV-Therapie

Die Mutationsrate des Hepatitis B Virus ist auf Grund der hohen Virusreplikationsrate und der fehlenden „proof-reading“-Funktion der viralen Polymerase sehr hoch und es werden während der HBV-Replikation viele Quasispezies gebildet. Quasispezies sind HBV-Stämme mit Spontanmutationen, die unter antiviraler Therapie mit Nukleotidanaloga als Resistenzmutationen selektiert werden können (Kap. 1.3.2.2). Um neben den bisher in der Literatur beschriebenen Resistenzmutationen rtN236T und rtA181V eventuell neue unter ADV-Therapie selektierte relevante Mutationen zu finden, wurden die HBV-reverse Transkriptase-(RT)-Domänen von 276 Patienten mit einem schlechtem Ansprechen oder mit sekundärem Therapieversagen gegenüber der ADV-Therapie nach einer PCR-Amplifikation

sequenziert und in einem Sequenzabgleich mit einer Referenzsequenz auf Mutationen in der HBV-RT-Domäne untersucht (Abb. 15) (Kap.2.7). Es wurden alle vom Referenzstamm abweichenden Basen innerhalb der RT-Domäne der HBV-Polymerase ausgewertet und deren Häufigkeit bestimmt.

In den analysierten HBV-RT-Domänen fanden sich durchschnittlich 14 Mutationen in einer HBV-RT-Domäne (Standardabweichung +/- 8 Mutationen) mit einer Spannweite von 0-32 Mutationen. Viele dieser Mutationen stellten auf Grund der hohen Mutationsrate des Hepatitis B Virus meist zufällige, polymorphe Mutationen dar und wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Polymorphe Mutationen liegen in natürlich polymorphen, nicht konservierten Bereichen der reversen Transkriptase und treten auch bei unbehandelten Patienten auf. Die polymorphen Bereiche in der reversen Transkriptase wurden unter anderem von Yang et al. in einer Datenbankanalyse von 70 HBV-Wildtyp-Sequenzen definiert, wobei sich in seiner Studie 134 der 344 Aminosäuren als polymorph herausstellten (Yang, Westland et al. 2002). Ausgeschlossen werden kann aber nicht, dass solche Mutationen nicht relevant hinsichtlich einer Therapieresistenz sind. Abb.16 zeigt die relativen Häufigkeiten der identifizierten Mutationen bezogen auf alle Patienten.

Bei der Auswertung der Häufigkeit des Auftretens verschiedener Mutationen zeigte sich, dass bestimmte Mutationen in höherer Frequenz auftraten: rtL122F (126/276, 45 %), rtN124H (137/276, 50 %), rtP130Q (126/276, 46 %) und rtD131N (136/276, 49 %). Diese Mutationen wurden insgesamt bei 60 % der Patienten identifiziert und liegen in natürlich polymorphen Bereichen der reversen Transkriptase. Die bereits als ADV-Resistenzmutationen publizierte Mutationen rtA181V und/oder rtN236T fanden sich in diesem Patientenkollektiv bei 13 % bzw. 8 %, rtA181V (37/276) und rtN236T (23/276). Die kürzlich veröffentlichte Mutation rtI233V konnte bei keinem der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Schildgen, Sirma et al. 2006). Die Assoziation dieser Mutation mit einer ADV-Resistenz bleibt somit in dieser Auswertung fragwürdig. Die statistische Analyse zeigte weiter ein gehäuftes Auftreten der Mutation

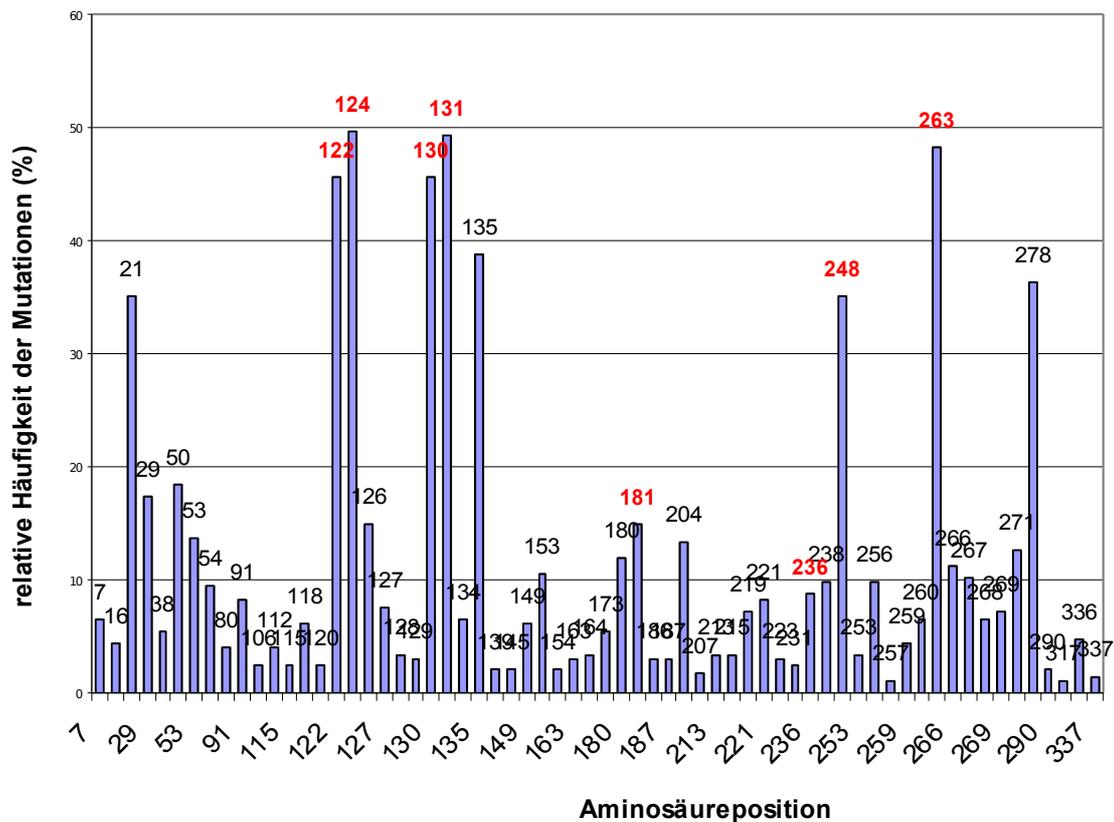


Abb. 16: Darstellung der relativen Häufigkeiten einzelner Mutationen (%) der reversen Transkriptase-(RT)-Domäne des HBV Genoms der analysierten Patientenproben bezogen auf alle Proben. Polymorphe Mutationen rtL122F, rtN124H, rtP130Q, rtD131N, die häufig vorkommenden Mutationen rtN248H und rtE263D und die Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T sind rot markiert.

3.1.4 Analyse der Korrelation der Polymerasegenmutationen mit ADV-Therapieresistenz

Eine große Anzahl der in dieser Arbeit identifizierten Mutationen sind in polymorphen Regionen der HBV-RT-Domäne lokalisiert und daher mit geringerer Wahrscheinlichkeit mit einer ADV-Resistenz assoziierbar (Yang et al., 2002). Bei weiteren Mutationen, wie z.B. an Positionen rtV84M, rtS85A, rtN134D, rtA181T, rtT184S, rtQ215S, rtI233V, rtP237H, rtN238T/D wird in der Literatur diskutiert, ob sie maßgeblich an einem Nicht-Ansprechen oder einer

Resistenz gegenüber der ADV-Therapie beteiligt sind (Bartholomeusz 2004; Gerolami, Bourliere et al. 2006; Schildgen, Sirma et al. 2006). Um diese Vermutungen zu überprüfen und weiterhin um potentiell neue Zusammenhänge von Polymerasegenmutationen mit einer ADV-Therapieresistenz feststellen zu können, wurde die Korrelation jeweils einer einzelnen Polymerasemutation mit einer ADV-Therapieresistenz statistisch in einem Exakten Fisher-Test geprüft. Das Auftreten einer ADV-Therapieresistenz wurde dafür als ein Anstieg der Viruslast um eine logarithmische Stufe definiert.

Eine Korrelation mit einer ADV-Therapieresistenz zeigten in der Auswertung dieser Untersuchung die Mutationen an den Positionen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128N/I ($p=0,035$) und rtL231V ($p=0,015$) (Abb. 17). Der p-Wert der Mutation rtN236T lag bei 0,029 und bestätigt den Zusammenhang dieser Mutation mit einer Resistenz gegenüber einer antiviralen Therapie mit ADV, wie er schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Generell war eine Mutation an der Position rt236 mit einem $p=0,04$ signifikant mit einer Resistenz verbunden. Die p-Werte der Mutationen an den Aminosäurepositionen rtL122F ($p=0,684$), rtN124H ($p=0,102$), rtP130Q ($p=0,103$) und rtD131N ($p=0,064$) waren statistisch nicht signifikant mit einer ADV-Therapieresistenz korreliert, was den polymorphen Charakter dieser Mutationen bestätigt, wie er von Yang beschrieben wurde (Yang, Westland et al. 2002). Die vermuteten Resistenzmutationen rtV84M, rtS85A, rtT184S, rtI233V und rtP237H (Bartholomeusz 2004; Schildgen, Sirma et al. 2006) konnten im Patientenkollektiv dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Es kann somit auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie keine Aussage über diese speziellen Mutationen getroffen werden. Die ebenfalls vermuteten Resistenzmutationen rtA181T ($p=1,0$), rtQ215S ($p=0,327$), rtN238T/D ($p=1,0$) und rtN134D ($p=0,064$) waren nicht signifikant mit einer Resistenz assoziiert (Abb. 17, Tab. 17), womit die Analysen den Vermutungen dieser Mutationen als Resistenzmutationen widersprechen.

Die Mutation rtN248H war positiv korreliert mit erhöhten Transaminasewerten ($r=0,65$; $p<0,0001$) (r , Korrelationskoeffizient), was eine mittlere Korrelation zwischen einer klinischen Resistenz und der Mutation rtN248H beschreibt. Da diese Daten einen eventuellen Einfluss dieser Mutation auf das Therapieansprechen auf ADV nahe legen, wurde diese Mutation im Folgenden phänotypisch untersucht (Kap. 3.2). Als Einzelmutation war diese Mutation jedoch nicht signifikant mit einer ADV-Resistenz verbunden ($p=0,668$).

Die isolierte Mutation rtE263D wurde mit 116/276 (42 %) sehr häufig identifiziert. Sie war nicht mit einer ADV-Resistenz korreliert ($p=0,68$). Dies kann darauf hindeuten, dass diese Mutation isoliert als Polymorphismus gewertet werden kann. Jedoch trat sie wie in Kap. 3.1.3 beschrieben häufig in Kombination mit der Mutation rtN248H auf, was wiederum auf einen Zusammenhang dieser Doppelmutation mit einer Resistenzentwicklung hindeuten kann.

Als mögliche neue Resistenzmutationen gegenüber der ADV-Therapie konnten in der statistischen Auswertung dieser Arbeit Mutationen an den Stellen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128N/I ($p=0,035$) und rtL231V ($p=0,015$) identifiziert werden, wobei andere bislang vermutete Resistenzmutationen nicht bestätigt werden konnten. Die Mutation rtN248H lässt auf Grund der Korrelation mit dem erhöhten Transaminasewert ALT einen Einfluss auf ein Therapieversagen vermuten. Ebenso hat die häufig entdeckte Doppelmutation rtN248H/rtE263D möglicherweise einen Einfluss als kompensatorische Mutationen.

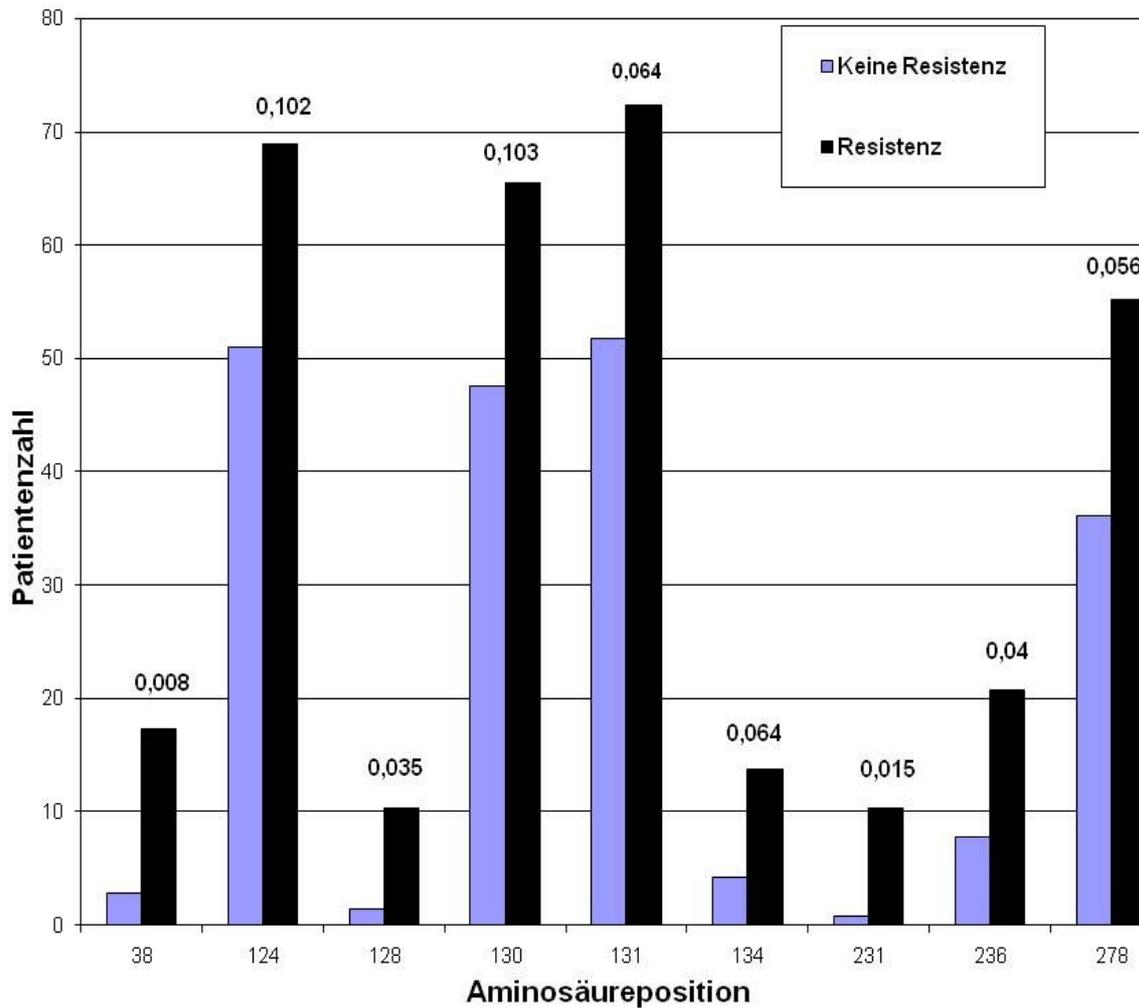


Abb. 17: Repräsentative HBV-Polymerasemutationen und ihre Korrelation mit der Sensitivität gegenüber der ADV-Therapie. Die statistische Signifikanz ist als p-Wert über den Balken angegeben (signifikant, $p < 0,05$). Die schwarzen Balken geben die Anzahl der Patienten ohne klinische Resistenz wieder, die blauen Balken die Anzahl der Patienten mit klinischer Therapieresistenz.

Tab. 17: Zusammenstellung ausgewählter Mutationen: Spalte 1: Aminosäurepositionen der Mutationen. Spalte 2: Absolute Häufigkeiten der Mutationen innerhalb des analysierten Kollektivs. Spalte 3: p-Werte der Korrelation der Mutationen mit einer Resistenzentwicklung gegenüber der ADV-Therapie, getestet im 2-seitigen Fisher Exakt Test. N.D., not detected, Mutation konnte in vorliegendem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

Aminosäureposition der Mutation	Absolute Häufigkeit	Exakter Test nach Fisher, 2seitige Signifikanz, p-Wert
rtA38E/T	15	0,008
rtV84M	N.D.	N.D.
rtS85A	N.D.	N.D.
rtL122F	126	0,684
rtN124H	137	0,102
rtT128I/N	9	0,035
rtP130Q	126	0,103
rtD131N	136	0,064
rtN134D	18	0,069
rtA181V	37	0,110
rtA181T	4	1,0
rtT184S	N.D.	N.D.
rtV214A	N.D.	N.D.
rtQ215S	9	0,327
rtI233V	N.D.	N.D.

rtL231V	7	0,015
rtN236T	23	0,029
rtP237H	N.D.	N.D.
rtN238T/D	25	1,0
rtN248H	97	0,669
rtE263D	116	0,680

3.2 Funktionelle phänotypische Analysen der Selektion von Resistenzmutationen

Die vorangegangenen genotypischen Untersuchungen zur Selektion und zum Vorkommen von Mutationen unter antiviraler Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV haben gezeigt, dass die Mutationen an den Positionen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128N/I ($p=0,035$) und rtL231V ($p=0,015$) signifikant mit einer ADV-Therapieresistenz assoziiert sind. Weiter war die häufig identifizierte Mutation rtN248H (97/276; 35 %) unter anderem positiv korreliert mit dem Transaminasewert ($r=0,65$, $p<0,0001$) (Kap. 3.1.3). Die statistische Auswertung zeigte zudem, dass die Mutation rtN248H zu 71 % (82/116) in Kombination mit der Mutation rtE263D vorkam, welche insgesamt in 116/276 (42 %) der Fälle zu identifizieren war. Da diese Patienten alle ein Therapieversagen zeigten, sollte in funktionellen Zellkulturexperimenten der phänotypische Einfluss der genannten Mutationen und der Doppelmutation rtN248H/rtE263D auf das Ansprechen gegenüber der antiviralen Therapie mit ADV geprüft werden. Für die Untersuchungen wurden replikationskompetente HBV-Plasmide mit der entsprechenden Mutation konstruiert (Kap. 3.2.1) und ihre Sensitivität gegenüber ADV in funktionellen Zellkulturexperimenten untersucht. Die Sensitivität der HBV-Polymerasemutationen gegenüber ADV wurde dann über

eine Dosis-Wirkungskurve kalkuliert (Kap. 3.2.3), um so die Replikationskompetenz der Polymerasemutationen unter ADV-Behandlung bestimmen zu können.

3.2.1 Generierung von replikationskompetenten HBV-Plasmiden mit Polymerasemutationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden replikationskompetente Plasmide mit den einzelnen Mutationen rtN248H, rtE263D, rtA38T, rtN134D und rtL231V und weiter ein replikationskompetentes Plasmid für die Doppelmutation rtN248H/rtE263D generiert, um den Einfluss dieser Mutationen auf die Sensitivität gegenüber einer ADV-Therapie untersuchen zu können. Die Versuche erfolgten exemplarisch in replikationskompetenten Plasmiden des Genotyps D (Subtyp ayw), da dieser Genotyp in dem analysierten Patientenkollektiv am häufigsten zu finden war und zudem die zu untersuchenden Mutationen im HBV-Genotyp D zu identifizieren waren. Die zu untersuchende Punktmutation wurde über eine gerichtete Mutagenese in das HBV-Polymerasegen eingeführt (Kap. 2.8.1), nachdem dieses für die Mutagenese über einen Kassettenaustausch in einen pGEM-T-Easy-Klonierungsvektor kloniert worden war. Nach der Mutagenese wurde das HBV-Polymerasegen in das replikationskompetente HBV-Volllänge-Plasmid religiert. Der Kassettenaustausch erfolgte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NcoI*. Die Genkarten (Abb. 18) zeigen beispielhaft am replikationskompetenten Plasmid pHBV ayw 248/263 die Positionen der Mutationen innerhalb des Polymerasegens im HBV-Volllänge-Plasmid. Zur Überprüfung der Klonierung wurden die neu konstruierten Plasmide sequenziert. Abb. 19. zeigt die Sequenzierungsergebnisse der in die Plasmide pHBV ayw N248H und pHBV ayw E263D eingefügten Punktmutationen rtN248H und rtE263D.

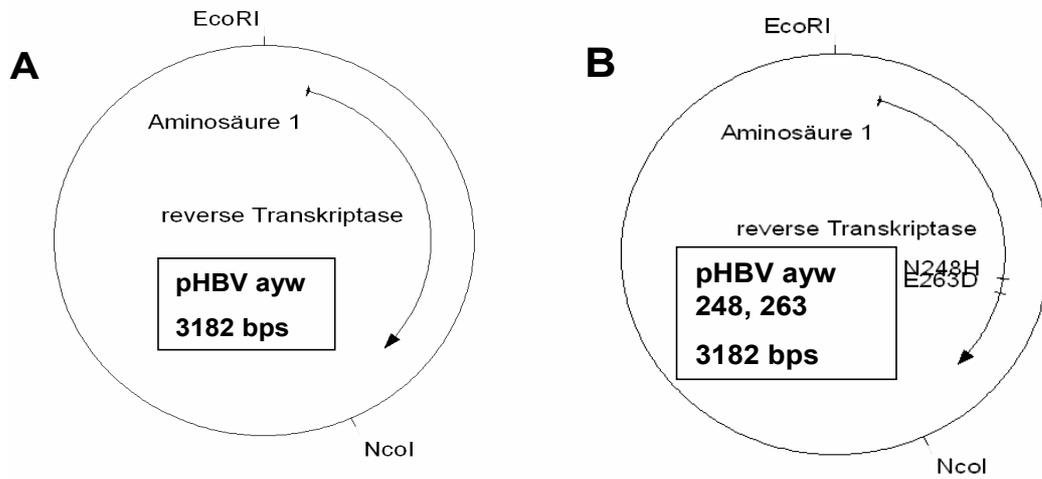


Abb. 18: Plasmidkarten der HBV-replikationskompetenten Plasmide mit HBV-Gesamtgenom von 3182 Basenpaaren (bps): (A) pHBV ayw Wildtyp 1,28, (B) pHBV ayw N248H/E263D. Aminosäure 1: erste Aminosäure der HBV-reverse Transkriptase-Domäne nach Standardnummerierung. *EcoRI* und *NcoI*: Restriktionsenzymchnittstellen für den Kassettenaustausch der Klonierung.

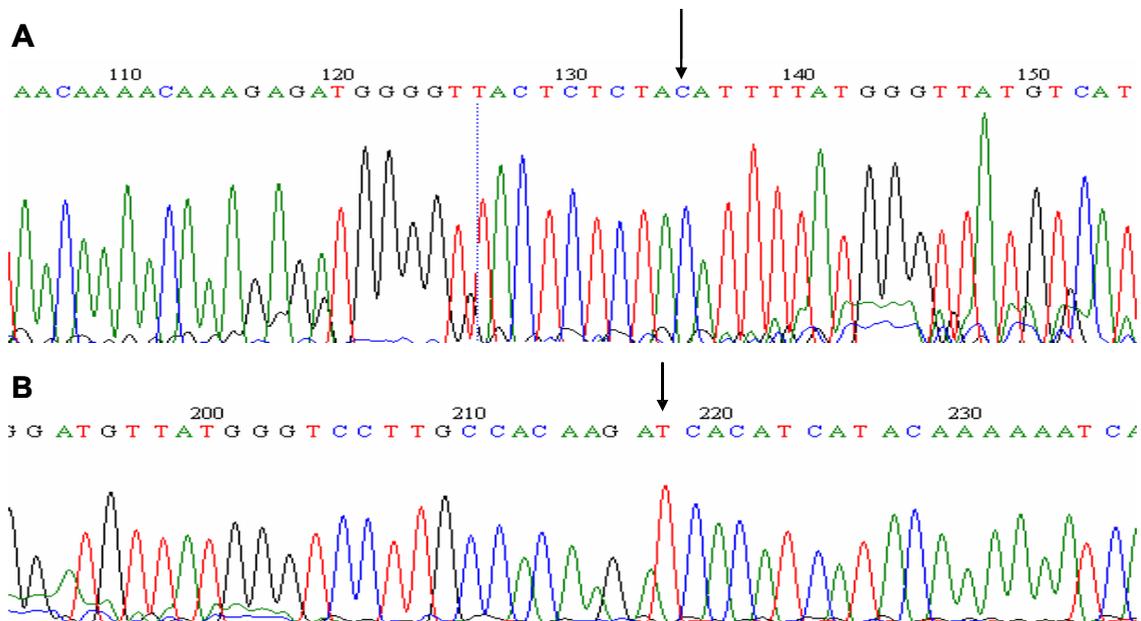


Abb. 19: Sequenzierungsergebnisse der neu generierten HBV-Konstrukte: (A) pHBV ayw N248H, (B) pHBV ayw E263D, mutierte Base ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.2.2 Bestimmung der Replikationskompetenz der neu generierten HBV-Konstrukte

3.2.2.1 Bestimmung der Replikationskompetenz der HBV-Plasmide im DNA-Nachweis

Vor den Zellkulturexperimenten sollten die neu generierten Klone (rtN248H, rtE263D, rtA38T, rtN134D, rtL231V und rtN248H/rtE263D) auf ihre Replikationsfähigkeit getestet werden. Dazu wurde in einem semiquantitativen HBV-DNA-Nachweis die Replikation der neu generierten Konstrukte im Vergleich zu Wildtyp-Plasmiden pHBV ayw 1,28 analysiert (Kap. 2.8.2.7). Replikationskompetente Wildtyp-Plasmide und replikationskompetente Plasmide mit der Doppelmutation pHBV ayw 248/263 wurden dafür in HuH-7 Zellen transkribiert. Die während der Replikation sezernierten viralen Kapside wurden nach einer Inkubation von 120 Stunden aus dem Mediumüberstand mit Polyethylenglykol (PEG) gefällt (Kap. 2.8.2.5), wobei anschließend die HBV-DNA isoliert und in einer nested-PCR für den S-Gen Bereich des HBV-Genoms amplifiziert wurde (Kap. 2.8.2.6). Das PCR-Produkt wurde in Agarose-Gelelektrophorese-Experimenten dargestellt. Es zeigte sich in diesen Experimenten eine vergleichbare Replikationskompetenz der Plasmide der Doppelmutation pHBV ayw 248/263 mit der Replikationskompetenz der Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28.

3.2.2.2 Bestimmung der Replikationskompetenz der HBV-Plasmide im RNA-Nachweis

Für die Replikationskompetenz der neu generierten Klone sollte neben der Bestimmung der HBV-DNA auch die neu transkribierte HBV-RNA Menge überprüft werden. Dazu wurden die im HBV-Genotyp D generierten HBV-Plasmide pHBV ayw E263D, pHBV ayw N248H und pHBV ayw N248H/E263D sowie HBV-Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 in HuH-7 Zellen transfiziert. Die

RNA-Isolation erfolgte 120 h nach der Transfektion aus dem Zellpellet der Zellkulturansätze. In einer One-Step RT-PCR für den S-Gen-Bereich des HBV-Genoms wurde die RNA revers transkribiert, amplifiziert und anschließend in Agarose-Gelelektrophorese- Experimenten dargestellt (Kap. 2.8.2.10). In den gezeigten Versuchen (Abb. 20) wurden die Plasmide pHBV ayw N248H/E263D und pHBV ayw E263D im Vergleich mit Wildtyp-Plasmiden pHBV ayw 1,28 untersucht. Das Gelbild der isolierten HBV-RNA zeigte vergleichbare RNA-Mengen der untersuchten Klone mit der des Wildtyp-Plasmids.

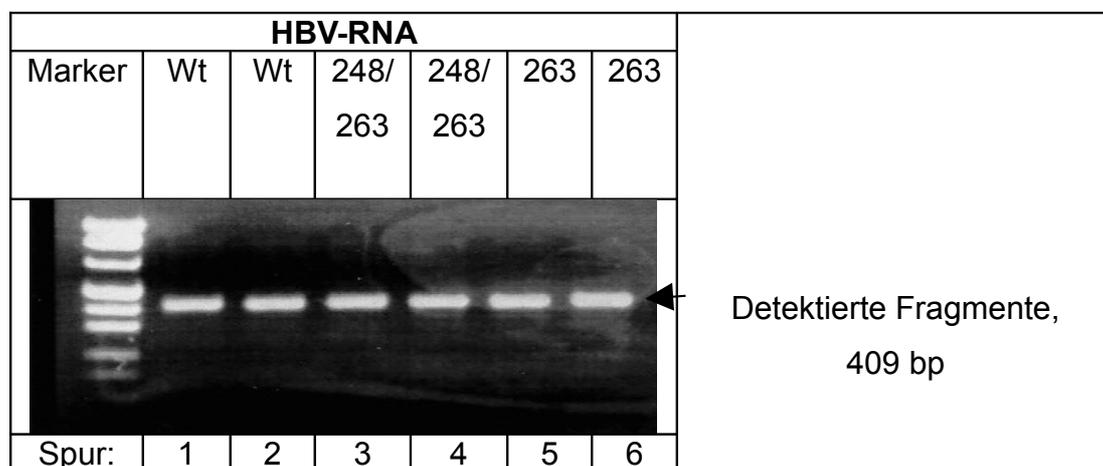


Abb. 20: Detektion der HBV-RNA in Agarose-Gelelektrophorese Experimenten, HBV mRNA wurde 120 Stunden nach Transfektion der zu untersuchenden Plasmide in HuH-7 Zellen analysiert. Wt, Wildtyp, pHBV ayw 1,28 (HBV Genotyp D) (Spur 1 und 2), pHBV ayw 248/263 (Spur 3 und 4), pHBV ayw 263 (Spur 5 und 6). Das detektierte Fragment mit 409 Basenpaaren (bp) liegt im S-Genbereich des HBV-Genoms. Marker, Lambda-puC Mix Marker 4.

3.2.3 *In vitro* Analyse der Sensitivität von HBV-

Polymerasemutationen gegenüber Adefovir dipivoxil

In den genotypischen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die Mutation rtN236T wie schon in der Literatur beschrieben mit einer signifikant hohen ADV-Resistenz verbunden ist (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Weiter konnte nach der statistischen Auswertung der untersuchten

Patientenproben für die Mutation rtN248H eine Assoziation mit einem verminderten Ansprechen auf ADV angenommen werden (Kap. 3.1.4). Um den Einfluss dieser Mutationen phänotypisch *in vitro* zu überprüfen, wurden sie in funktionellen Zellkulturexperimenten untersucht. Dazu wurden die replikationskompetenten Plasmide pHBV ayw N236T und pHBV ayw N248H sowie HBV Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) in HuH-7 Zellen transfiziert und mit verschiedenen ADV-Endkonzentrationen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) für 96 Stunden behandelt. Nach Isolation der intrazellulär neu gebildeten Viruskapside mittels Immunpräzipitationsexperimenten wurde die HBV-DNA extrahiert und anschließend in TaqMan[®]-PCR Assays absolut quantifiziert (Kap. 2.8.2.5). Funktionelle Ansätze mit HBV Wildtyp-Plasmiden pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) (Kap. 2.8.1.1) dienten als Referenzwert für die Auswertung der Ansätze mit mutierten Plasmiden pHBV ayw N236T und pHBV ayw N248H (beide HBV-Genotyp D), wobei die Replikationskompetenz der Plasmide mit Polymerasemutationen mit der Replikationskompetenz der Wildtyp-Plasmide unter ADV-Behandlung verglichen wurde. Als vergleichbarer Wert für die Replikationskompetenz der Polymerasemutationen mit der des Wildtyp-Stamms diente die Effektive Dosis (Effective Concentration, (EC_{50})). Die EC_{50} gibt diejenige Medikamentenkonzentration im jeweiligen funktionellen Ansatz an, bei der die Virusreplikation um 50 % unterdrückt wurde. Die Darstellung der Ergebnisse (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23) sind eine Zusammenfassung jeweils dreifach durchgeführter funktioneller Experimente.

3.2.3.1 Replikationskompetenz der HBV Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil

Um einen Vergleichspunkt für die Analyse der Replikationskompetenz der mutierten HBV-Konstrukte pHBV ayw N236T und pHBV ayw N248H (HBV-Genotyp D) in funktionellen Ansätzen zu erhalten, wurden Zellkulturexperimente mit HBV Wildtyp-Plasmiden pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) (Kap. 2.8.1.1) durchgeführt und die EC_{50} als Referenzwerte bestimmt. Die mit Wildtyp-

Plasmiden pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) transfizierten Hepatomzellen HuH-7 wurden mit ADV-Endkonzentrationen von 0 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM behandelt. Anschließend wurde die neu synthetisierte HBV-DNA quantitativ bestimmt. Es zeigte sich in diesen Experimenten eine hohe Sensitivität der HBV-Replikation der HBV-Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) gegenüber der ADV-Behandlung. Die Virusreplikation nahm signifikant mit steigenden ADV-Konzentrationen innerhalb der Konzentrationsreihe von 0 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM linear ab. Als EC_{50} errechnete sich für die HBV-Replikation der Wildtyp-Plasmide eine ADV-Konzentration von 3 μM (Abb. 21, .Tab. 18).

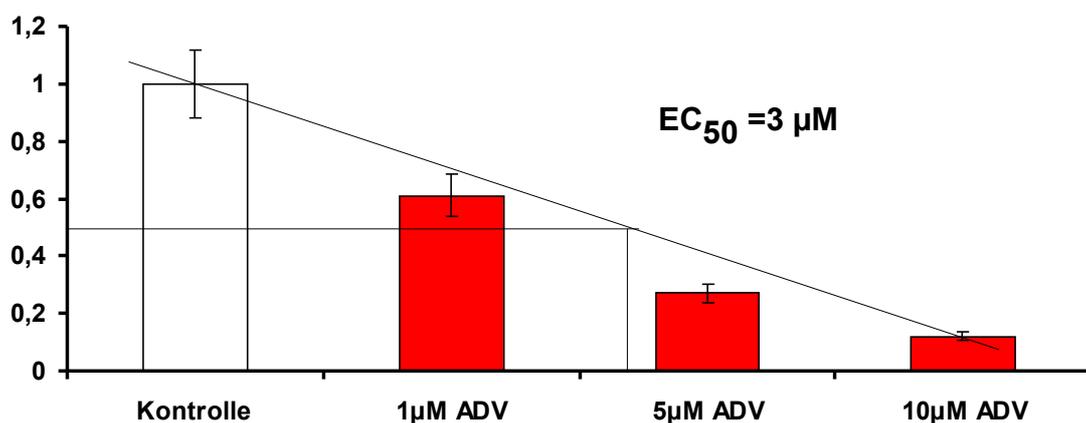


Abb. 21: Sensitivität der HBV-Wildtyp-Plasmide pHBV ayw 1,28 (HBV-Genotyp D) gegenüber der ADV-Behandlung: Es zeigte sich in der quantitativen TaqMan-PCR zur Analyse der HBV-Viruslast ein konzentrationsabhängiger Abfall der Virusreplikation bei einer ADV-Konzentrationsreihe mit 0 μM (Kontrolle=1), 1 μM , 5 μM und 10 μM . Die EC_{50} lag hier bei einer ADV-Konzentration von 3 μM .

3.2.3.2 Replikationskompetenz der Resistenzmutation rtN236T unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil

Um den Einfluss der bekannten ADV-Resistenzmutation rtN236T auf das Ansprechen gegenüber einer ADV-Behandlung zu überprüfen, wurden funktionelle Zellkulturexperimente mit HBV-Plasmiden mit der Polymerasemutation rtN236T durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war die

EC_{50} als Referenzwert mit einer bekannten ADV-Therapieresistenz assoziierten Mutation zu erhalten, um das Verhalten der in der vorliegenden Arbeit neu identifizierter Mutationen vergleichen zu können.

Dementsprechend wurden replikationskompetente Plasmide mit der Mutation rtN236T, pHBV ayw N236T (HBV-Genotyp D) in Zellkulturansätzen in einer ADV-Konzentrationsreihe mit Endkonzentrationen von 0 μM (Kontrolle), 1 μM , 10 μM und 20 μM analysiert und mit der in Kapitel 2.8.2.8 beschriebenen Methodik zur Quantifizierung der HBV-Viruslast die EC_{50} bestimmt. Abb. 22 zeigt die Reaktion dieser spezifischen HBV-Mutanten auf die Behandlung mit ADV. Die Analysen der rtN236T-Mutationskonstrukte zeigten keine Sensitivität gegenüber ADV mit fehlender Unterdrückung der Virusreplikation. Die EC_{50} war nicht zu bestimmen und lag demzufolge bei über 20 μM ADV, wodurch die Mutation mit einer mehr als 6,7fachen Erhöhung der EC_{50} im Vergleich zum HBV-Wildtyp (EC_{50} von 3 μM) signifikant als Resistenzmutation nachgewiesen wurde (Tab. 18).

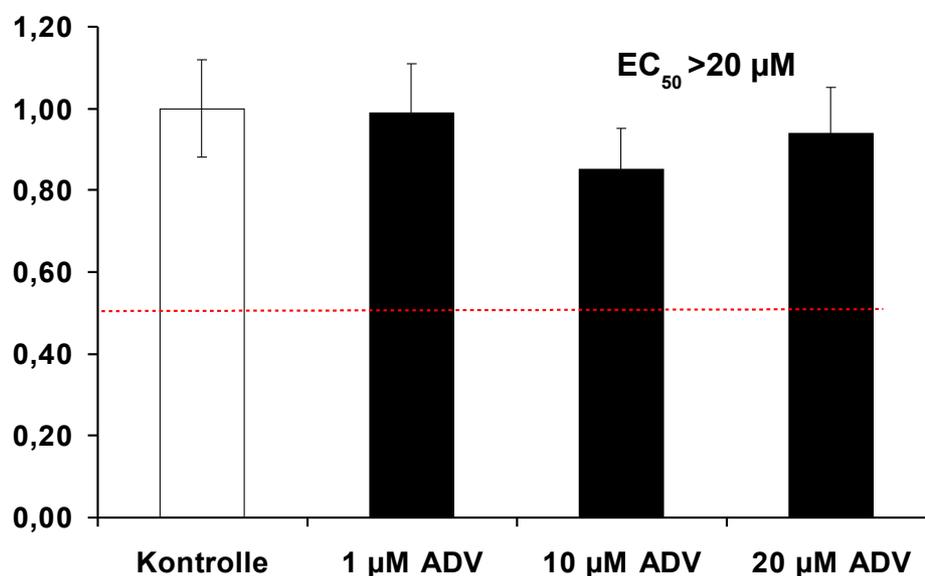


Abb. 22: Sensitivität der HBV-Resistenzmutation rtN236T gegenüber der ADV-Behandlung: Bei steigenden ADV-Konzentrationen von 0 μM , 1 μM , 10 μM und 20 μM war in der quantitativen TaqMan-PCR zur Analyse der HBV-Viruslast keine Sensitivität gegenüber ADV sowie keine

Suppression der Virusreplikation nachweisbar. Die EC_{50} lag über 20 μM ADV. Kontrolle (=1) entspricht 0 μM ADV.

3.2.3.3 Replikationskompetenz der Polymerasemutation rtN248H unter Behandlung mit Adefovir dipivoxil

Die Mutation rtN248H war nach der statistischen Auswertung der genotypischen Untersuchung positiv mit dem Transaminasewert ALT korreliert ($r=0,64$). Es lag somit der Verdacht nahe, dass diese Mutation das Ansprechen auf eine ADV-Therapie beeinflusst. Um dies zu prüfen, wurden replikationskompetente Plasmide pHBV ayw N248H (Kap. 2.8.1.1) in weiteren funktionellen Zellkulturexperimenten untersucht.

Die experimentellen Zellkulturansätze wurden mit ADV-Endkonzentrationen von 0 μM , 1 μM , 10 μM und 20 μM behandelt. HBV-Konstrukte, welche die Mutation rtN248H inseriert hatten, zeigten in den funktionellen Experimenten eine eher moderate Reduktion der Virusreplikation mit verminderter Sensitivität gegenüber der ADV-Behandlung. Die Virusreplikation nahm bis zu einer ADV-Konzentration von 10 μM ADV mäßig ab und stieg bei einer Konzentration von 20 μM statistisch nicht signifikant leicht an, wobei dieses Phänomen nicht eindeutig erklärbar ist. Möglicherweise liegt hier eine so genannte „high-zone tolerance“ vor (Abb. 23). Als EC_{50} konnte eine ADV-Konzentration von 12 μM bestimmt werden, die somit 4fach erhöht war im Vergleich zur EC_{50} des Wildtyps von 3 μM . Die Mutation rtN248H zeigt somit eine reduzierte Sensitivität gegenüber der Behandlung mit ADV (Abb. 23, Tab. 18). Gestützt wird dieses Ergebniss durch die statistische Auswertung, in der die Mutation rtN248H eine mittlere positive Korrelation mit erhöhten Transaminasenwerten zeigte ($r=0,65$; $p<0,001$) (r , Korrelationskoeffizient), wobei sie sich mit einer Therapieresistenz definiert als ein log Anstieg der Viruslast nicht signifikant in Verbindung bringen ließ ($p=0,669$).

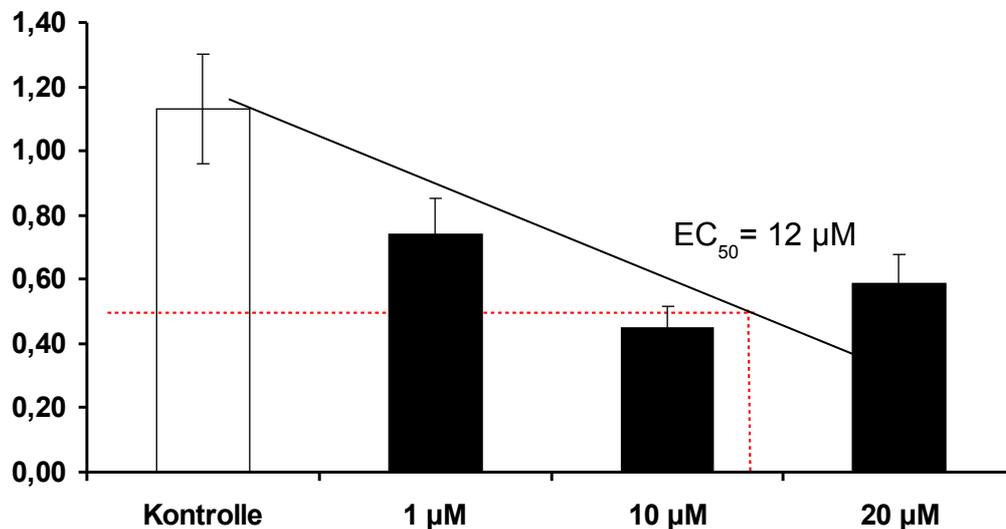


Abb. 23: Sensitivität der Mutation rtN248H gegenüber der ADV-Behandlung: Bei steigenden ADV-Konzentrationen von 0 µM, 1 µM, 10 µM und 20 µM war in der quantitativen TaqMan-PCR zur Analyse der HBV-Viruslast eine verminderte Sensitivität mit moderater Reduktion der Virusreplikation gegenüber der ADV-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die EC_{50} liegt bei 12 µM. Kontrolle (=1) entspricht 0 µM ADV.

Tab. 18: *In vitro* Sensitivität der Mutationen rtN236T und rtN248H gegenüber einer Behandlung mit ADV im Vergleich mit dem HBV Wildtyp-Stamm: *=signifikant, **= moderat.

Polymerasemutation	ADV EC_{50} (µM)	x-fache Resistenz
Wildtyp	3	1
rtN236T	>20	> 6,7 fach *
rtN248H	12	4 fach **

4 Diskussion

Weltweit sind 400 Millionen Menschen chronische Hepatitis B-Virus-träger, wobei an den Krankheitsfolgen einer chronischen HBV-Infektion jährlich ungefähr eine Million Menschen versterben (RKI 2006). Für die Therapie der chronischen HBV-Infektion stehen Interferon- α (IFN- α) und Nukleos(tid)analoge zur Verfügung. IFN- α kann durch eine aber eher seltene Eradikation des HBV als einziges Medikament zu einer Ausheilung der Infektion führen, die Anwendung ist jedoch durch ein großes Nebenwirkungsspektrum limitiert. Die Alternative zur IFN- α -Therapie stellen Nukleos(tid)analoge dar, welche über eine Hemmung der reversen Transkriptase unter anderem die Viruslast drastisch reduzieren können (Tillmann 2007). Ihr Einsatz ist jedoch durch die Selektion von Resistenzmutationen während des Therapieverlaufs eingeschränkt, was ein enormes klinisches Problem darstellt, da es zu einem Therapieversagen und Wiederaufflammen der Virusreplikation kommen kann.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, anhand von patientenspezifischen Daten und in funktionellen Zellkulturexperimenten die Entwicklung und das Vorkommen von neuen, bislang nicht identifizierten Resistenzmutationen in der HBV-reverse Transkriptase-(RT-)Domäne gegenüber der antiviralen Therapie mit Nukleos(tid)analoge, insbesondere dem Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil (ADV), zu untersuchen. Es erschien dabei insbesondere wichtig, virale und klinische Parameter zu charakterisieren, welche eine mögliche Resistenzentwicklung beeinflussen können. In genotypischen Untersuchungen der HBV-RT-Domänen der Patientenproben mit ADV-Therapieversagen wurden so neue Resistenzmutationen identifiziert, welche potentiell mit einer Therapieresistenz oder schlechtem Ansprechen gegenüber der ADV-Therapie in Verbindung gebracht werden können. Unter ADV-Therapie wurden bislang die Mutationen rtN236T und rtA181V als Resistenzmutationen beschrieben (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Die hier

vorgelegten und andere Studien deuten aber eindeutig darauf hin, dass neben den Mutationen rtN236T und rtA181V weitere Mutationen im HBV-Polymerasegen an der ADV-Therapieresistenzentwicklung beteiligt sein können. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit in funktionellen Experimenten der direkte Einfluss einer vorgefundenen spezifischen Mutation auf die Behandlung mit ADV *in vitro* analysiert, um deren Relevanz und Sensitivität gegenüber ADV zu überprüfen. Die Identifikation und Charakterisierung neuer Resistenzmutationen, auch mit nur verminderter Sensitivität gegenüber ADV, hat für das Management der chronischen Hepatitis weitreichende Folgen.

4.1 Einfluss der Vorbehandlung mit IFN- α und Lamivudin auf die Resistenzentwicklung gegenüber Adefovir dipivoxil

Eine chronische HBV-Infektion wird bis heute primär mit IFN- α behandelt, da unter einer IFN-Therapie die Chance einer Ausheilung unter den zur Verfügung stehenden Therapeutika bisher mit bis zu 40 % relativ gut ist. Diese Erfolgsrate wird vor allem bei den HBV-Genotypen A und B vorgefunden, die im Vergleich zu den HBV-Genotypen D und C deutlich besser auf die IFN- α Therapie ansprechen, wobei HBV-Genotyp A im Vergleich zu D (33 % zu 11 %) und HBV-Genotyp B im Vergleich zu C (39 % zu 17 %) höhere HBeAg-Serokonversionsraten zeigen (Wai, Chu et al. 2002; Erhardt, Blondin et al. 2005). Eine IFN-Therapie ist in HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten mit kompensierter Lebererkrankung indiziert. Patienten, die virologisch, biochemisch und klinisch eine chronische HBV-Infektion aufweisen, werden für 12 bis 24 Wochen mit Standard-IFN- α behandelt, HBeAg-negative Patienten darüberhinaus für bis zu zwei Jahren. PEG-IFN ist mit vergleichbarem Therapieansprechen wie Standard-IFN aufgrund der nur einmal wöchentlichen Anwendung im Vergleich zur dreimal wöchentlichen Anwendung

dem Standard-IFN vorzuziehen (Cornberg, Protzer et al. 2007)(Kap.1.3.1). In den Seren des Patientenkollektivs der vorliegenden Arbeit waren, soweit Angaben zur Verfügung standen, bis auf zwei Patienten alle leitliniengerecht mit IFN- α vorbehandelt. Wenn Patienten nicht auf die IFN- α -Behandlung ansprechen oder die Therapie wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden muss, stellen die Nukleos(tid)analoga eine Therapiealternative dar. Lamivudin wird nach wie vor aufgrund seiner Effektivität, seiner Sicherheit und der geringen Kosten als Medikament der ersten Wahl eingesetzt. Dementsprechend waren 109/276 der in dieser Studie analysierten Patientenproben mit Lamivudin vorbehandelt. Eine frühere Lamivudinresistenz wurde bei 109/276 (39 %) identifiziert, bei 157/276 (57 %) lagen keine Angaben zur Lamivudin-Vortherapie vor. Zum Zeitpunkt der genotypischen Untersuchung dieser Arbeit wurden alle Patienten mit ADV behandelt und es zeigte sich noch bei ungefähr einem Fünftel der Patienten (58/276; 21 %) genotypisch eine Lamivudinresistenz (Kap. 3.1.1). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass nach Absetzen der Lamivudin-Therapie der lamivudinresistente HBV-Stamm wieder von einem Wildtyp-Stamm verdrängt wird und unter anschließender ADV-Therapie neue HBV-Quasispezies mit einer potentiellen ADV-Resistenz aus den vorhandenen HBV-Quasispezies selektiert wurde. Dieses Phänomen wurde auch von Villeneuve et al. beschrieben (Villeneuve, Durantel et al. 2003).

Nach einer Studie von Lampertico et al. verringert sich das Risiko einer ADV-Resistenzentwicklung in Anschluss an die Entwicklung einer Lamivudinresistenz von 5 % auf 0,8 % in chronisch HBV-infizierten Patienten, wenn Lamivudin nicht abgesetzt, sondern zusätzlich zu ADV als „add-on“ weitergegeben wird (Lampertico, Vigano et al. 2007) (Lampertico et al., 2007). Delaney et al. konnte in seiner Untersuchung Lamperticos Ergebnisse bestätigen. Er konnte während einer Kombinationstherapie von Lamivudin und ADV nach fünf Jahren keine der bislang beschriebenen ADV-Resistenzen identifizieren (Delaney 2007). Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen keinen eindeutigen Rückschluss darauf

zu, welche Patienten mit einer Kombinationstherapie bzw. einer ADV-Monotherapie behandelt wurden.

4.2 Vermehrtes Auftreten HBeAg-positiver Infektionen

Bei der chronischen Hepatitis B finden sich zwei Formen einer chronisch aktiven Infektion; eine HBeAg-positive und eine HBeAg-negative Form. Die HBeAg-positive Infektion wird als Wildtyp-Infektion bezeichnet, während bei der HBeAg-negativen Infektion meist Core-/Präcoremutationen vorliegen und daher kein HBeAg gebildet wird. Die HBeAg-negative Infektion entwickelt sich direkt aus einer HBeAg-positiven Infektion oder nach einer Reaktivierung der Infektion aus dem inaktiven HBsAg-Trägerstatus. Sie ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf und schlechterem Langzeittherapieansprechen auf IFN und Nukleos(tid)analoga assoziiert (Kap. 1.2.2). Für HBeAg-negative Infektionen konnte bisher kein Behandlungsendpunkt festgelegt werden, da ein Therapieansprechen serologisch nicht wie bei HBeAg-positiven Infektionen durch eine HBeAg-Serokonversion angezeigt werden kann, sondern nur durch einen HBsAg Verlust, der mit 5 % über einen Behandlungszeitraum von fünf Jahren sehr selten zu beobachten ist. Folglich soll nach den Leitlinien (Cornberg, Protzer et al. 2007) eine HBeAg-negative Infektion mit allen damit verbundenen Risiken von Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen dauerhaft behandelt werden. Eine dauerhafte Unterdrückung der Virusreplikation wurde als Therapieziel definiert, um die Progression der Erkrankung so lange wie möglich aufzuhalten. Bei HBeAg-negativen Infektionen wird eine Therapie mit ADV, Entecavir oder Tenofovir präferiert, da eine Lamivudin- oder Telbivudintherapie eine geringere Ansprechrate zeigt. Sie geht aufgrund eines geringeren antiviralen Potentials und einer geringeren Resistenzbarriere mit einer höheren Selektionsrate von Resistenzmutationen einher.

Die Angaben über die Prävalenz der HBeAg-negativen Infektion unterscheiden sich in verschiedenen Untersuchungen deutlich, insgesamt ist aber eine steigende Prävalenz zu beobachten (Yim and Lok 2006). Niederau et al. hat mit 66,4 % der in dieser Studie untersuchten Patienten das Überwiegen der HBeAg-negativen Infektionen beschrieben (Niederau 2007), während Funk et al. 14% HBeAg-negative Infektionen in einer Studie aus Nordeuropa nachwies (Funk, Rosenberg et al. 2002).

Bei der Analyse des HBeAg-Trägerstatus der in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigten sich 67 % HBeAg-positive Infektionen. HBeAg-negative Infektionen waren zu 33 % nachweisbar. Diese Daten stehen im Kontrast zu den Daten von Niederau (Niederau 2007). Die Analyse der vorliegenden Arbeit zeigt jedoch in guter Übereinstimmung mit den Daten der Meta-Analyse von Funk et al. (14% HBeAg-negativen Infektionen) (Funk, Rosenberg et al. 2002) den Trend einer steigenden HBeAg-negativen Infektionsrate, wie dies auch von Yim und Lok beschrieben wurde (Yim and Lok 2006). Die Variabilität zwischen den verschiedenen Studien lässt sich mit einem unterschiedlichen ethnischen und geographischen Hintergrund der Patientenkollektive erklären. So sind HBeAg-negative Infektionen vermehrt im Mittelmeerraum zu finden. Die Patienten dieser Arbeit wurden nicht in Bezug auf ihre Herkunft untersucht, weshalb eine detailliertere Analyse nicht möglich war. Die Daten der vorliegenden Untersuchung deuten aber insgesamt daraufhin, dass HBeAg-positive HBV-Infektionen in der Bundesrepublik Deutschland nach wie vor häufiger im Vergleich zu HBeAg-negativen Infektionen auftreten.

4.3 Einfluss der zugrunde liegenden HBV-Genotypen auf die antivirale Therapie mit Nukleotidanaloga

Das Hepatitis B Virus wird in acht Genotypen (A-H) eingeteilt, wobei der HBV-Genotyp A in den USA und in Nord- und Mitteleuropa und der HBV-Genotyp D in Südeuropa, im Mittleren Osten und in Indien dominiert. Genotyp B und C

haben die höchste Prävalenz in Asien (Liu, Kao et al. 2005). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die HBV-Genotypen A (25 %) und D (56 %) vorgefunden. Das vermehrte Auftreten des HBV-Genotyps D im Vergleich zu HBV-Genotyp A ist für ein Patientenkollektiv aus Deutschland untypisch, da wie in der Literatur beschrieben in Deutschland und im übrigen Mittel- und Nordeuropa der HBV-Genotyp A vorherrscht (Liu, Kao et al. 2005). Diese Diskrepanz lässt sich jedoch mit dem Migrationshintergrund der untersuchten Patienten erklären.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der HBV-Genotyp die Progression der Lebererkrankung, die HBeAg-Serokonversionsrate und das Ansprechen auf die antivirale Therapie beeinflussen kann. Bislang sind verschiedene genotypabhängige Therapieerfolge der chronischen Hepatitis B-Infektion bekannt. Zum Beispiel erzielt die IFN- α -Behandlung bei HBV-Genotyp A im Vergleich zu D (33 % zu 11 %) und bei HBV-Genotyp B im Vergleich zu C (39 % zu 17 %) höhere HBeAg-Serokonversionsraten (Wai, Chu et al. 2002; Erhardt, Blondin et al. 2005). Weitere publizierte Untersuchungen zur Genotypabhängigkeit der Resistenzentwicklung unter Therapie mit Nukleos(tid)analoga zeigten für Lamivudin bei HBV-Genotyp A im Vergleich zu HBV-Genotyp D eine schnellere Resistenzentwicklung (Zollner, Petersen et al. 2004). Da die HBV-Infektion in Asien endemisch ist, sind die meisten bislang veröffentlichten Daten auf Vergleiche von HBV-Genotypen B und C bezogen. Für die HBV-Genotypen A und D existieren nur wenige Studien. Die Datenlage über das Vorkommen und Verhalten der HBV-Genotypen A und D in der westlichen Welt wächst jedoch aktuell. Bei der antiviralen Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV konnten bislang keine genotypabhängigen Unterschiede festgestellt werden. So konnte Westland et al. in einer Studie mit 694 Patienten in Bezug auf die Reduktion der HBV-DNA keine Korrelation mit dem HBV-Genotyp feststellen. Auch in der HBeAg-Serokonversionsrate fand er keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen Patienten mit verschiedenen HBV-Genotypen (Westland, Yang et al. 2003). Die Analyse einer

aktuelle Studie von 2008 wies ebenfalls keine Unterschiede im Therapieansprechen zwischen den HBV-Genotypen auf (Wiegand, Hasenclever et al. 2008). Aus den genotypischen Daten der vorliegenden Untersuchung konnte in guter Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur ebenfalls kein genotypabhängiges Schema des Therapieansprechens gegenüber der ADV-Therapie abgeleitet werden.

Vorliegende Daten sprechen somit gegen einen Einfluss des HBV-Genotyps auf die Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV. Folglich muss nach aktuellem Wissensstand bei einer Therapieplanung mit ADV der HBV-Genotyp nicht berücksichtigt werden. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, da in einer aktuellen Studie aus China der HBV-Genotyp B ein besseres virologisches Ansprechen zeigt als der HBV-Genotyp C. Diese Studie war jedoch nur über einen Behandlungszeitraum von 48 Wochen angelegt und die präsentierten Daten sind somit für den Langzeitverlauf der antiviralen Therapie mit ADV wenig aussagekräftig (Zeng, Deng et al. 2008).

4.4 Charakterisierung des Einflusses spezifischer HBV-Polymerasemutationen auf die antivirale Therapie mit Nukleos/tidanaloga

4.4.1 Selektion von HBV-Mutationen in der HBV-

Polymerasegen-Domäne gegenüber Nukleos/tidanaloga

Während der HBV-Replikation entstehen unabhängig von einer antiviralen Therapie aufgrund der hohen Replikationsrate des HBV und der fehlenden „proof-reading“-Funktion der reversen Transkriptase gehäuft Mutationen im Virusgenom. Diese Virusmutanten können dann so genannte Quasispezies im Serum des HBV-infizierten Patienten bilden. Die Sequenzanalyse der HBV-Polymerase zeigt daher bei unbehandelten Patienten eine Reihe von Spontanmutationen, welche als natürlich polymorphe Mutationen bezeichnet

werden können. Unter anderem haben Yang et al. über eine Datenbankanalyse von 70 HBV-Genomen polymorphe Bereiche in der HBV-Polymerase definiert, wobei sich 134 der 344 Aminosäuren als polymorph herausstellten (Yang, Westland et al. 2002). Initiale Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Regionen das Therapieansprechen gegenüber Nukleos/tidanaloga nicht beeinflussen und dementsprechend nur eingeschränkt mit einer Therapieresistenz in Verbindung gebracht werden können. Alle bisherigen Resistenzmutationen gegenüber Nukleos/tidanaloga wurden jedoch in hochkonservierten Bereichen des HBV-Genoms identifiziert. Solche spezifischen Resistenzmutationen sind z.B. die für die ADV-Therapie beschriebenen rtA181V und rtN236T Mutationen (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Die Therapieresistenzmutationen können im Therapieverlauf durch den Selektionsdruck der antiviralen Therapie aus dem vorhandenen „Pool“ der HBV-Quasispezies selektiert werden und ein Therapieversagen verursachen, wenn sie in ihrer Replikationskompetenz über den HBV-Wildtyp dominieren (Zoulim 2004). Bei der Aufklärung der Resistenzmechanismen gegenüber den verschiedenen Nukleos/tidanaloga muss daher auf die Differenzierung zwischen Spontanmutationen in natürlich polymorphen Bereichen und „echten“ Resistenzmutationen gegenüber den Nukleos/tidanaloga geachtet werden.

Um kontrovers diskutierte Mutationen weiter zu charakterisieren und eventuell neue Resistenzmutationen zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit bei 276 Patienten, die alle eine schlechte oder keine Sensitivität gegenüber der ADV-Therapie zeigten, genotypische Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Häufigkeiten der nachgewiesenen Mutationen bestimmt und mit Hilfe statistischer Analysen auf ihre Korrelation mit einer ADV-Resistenz ausgewertet (Kap.3.1.4).

In Übereinstimmung mit Yang et al. konnten die Mutationen rtL122F, rtN124H, rtP130Q und rtD131N in dieser Arbeit als primär polymorphe Mutationen identifiziert werden. Dies zeigte sich in ihrem überdurchschnittlich häufigen

Auftreten mit bei 60 % der analysierten Proben und ihrer fehlenden Korrelation mit einer ADV-Resistenz: rtL122F ($p=0,684$), rtN124H ($p=0,102$), rtP130Q ($p=0,103$) und rtD131N ($p=0,064$) (Yang, Westland et al. 2002) (Kap. 3.1.4). Die Relevanz weiterer Mutationen wird im Folgenden diskutiert.

4.4.2 Einfluss der Resistenzmutation rtN236T auf die Therapie mit Adefovir dipivoxil

Die Mutation rtN236T lokalisiert in der D-Domäne der HBV-Polymerase wurde nach der Einführung von Adefovir dipivoxil (Hepsera®) 2003 erstmals von Angus et al. als Resistenzmutation nachgewiesen und mehrfach bestätigt (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003; Hadziyannis, Tassopoulos et al. 2005). Während im ersten Therapiejahr in der Regel keine Resistenzmutationen gegenüber ADV auftreten, werden im zweiten Jahr bei 2-3 % der Patienten Resistenzmutationen selektiert. Diese Rate steigt bis zum fünften Therapiejahr im Verlauf auf 29 % (Tillmann 2007). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte bei 8,3 % der Patienten (23/276) die Mutation rtN236T als Resistenzmutation identifiziert werden, wobei diese Patienten jeweils erwartungsgemäß ein Therapieversagen zeigten. Die Mutation rtN236T war in der statistischen Auswertung der vorliegenden Untersuchung zudem mit einer ADV-Resistenz assoziiert ($p=0,04$) und zeigte auch in phänotypischen Experimenten dieser Arbeit mit einem Anstieg des EC_{50} -Werts um mehr als das 6,7fache im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ein signifikantes Resistenzverhalten gegenüber der antiviralen Behandlung mit ADV (Kap. 3.2.3.2). Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien zum Verhalten der Resistenzmutation rtN236T *in vitro*. Qi et al. fanden eine Reduktion der Empfindlichkeit gegenüber ADV um das 7fache (Qi, Xiong et al. 2007), Villeneuve et al. um das 4,4fache (Villeneuve, Durantel et al. 2003) und Angus et al. um das 23fache (Angus, Vaughan et al. 2003). Somit wurde in

dieser Arbeit in guter Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen die Mutation rtN236T als Resistenzmutation eindeutig bestätigt.

Die Identifizierung der Resistenzmutationen bei primärem oder sekundärem Therapieversagen ist für die Therapieplanung von entscheidender Bedeutung, da verschiedene Mutationen die Therapieanpassung unterschiedlich beeinflussen können. Bei Nachweis einer Einzelmutation rtN236T stehen als Therapieoptionen Tenofovir, Lamivudin und Entecavir zur Verfügung, da die Mutation rtN236T keine Kreuzresistenz mit Lamivudin zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt die zweite publizierte ADV-Resistenzmutation rtA181V eine Kreuzresistenz mit Lamivudin, weswegen bei der Therapieanpassung auf ein anderes Nukleos(tid)analogon als Lamivudin zurückgegriffen werden sollte (Brunelle, Jacquard et al. 2005; Delaney, Ray et al. 2006; Qi, Xiong et al. 2007). Die Therapieanpassung sollte immer als „Add-on“ Therapie erfolgen, um das Risiko einer weiteren Resistenzentwicklung zu minimieren (Cornberg, Protzer et al. 2007). Bei Vorliegen einer zusätzlichen Lamivudinresistenz sollte gemäß der Leitlinien Adefovir durch Tenofovir ersetzt werden und die Therapie zusätzlich mit einer Zugabe von Entecavir weitergeführt werden (Cornberg, Protzer et al. 2007). Die Mutation rtN236T zeigt eine vergleichbare Suszeptibilität auf Entecavir wie der HBV-Wildtyp-Stamm (Qi, Xiong et al. 2007). Das seit 2008 zugelassene Nukleotidanalogen Tenofovir steht für die Therapieanpassung nach einer ADV-Resistenzentwicklung zur Verfügung, obwohl es wie ADV zu der Klasse der Nukleotidanaloga gehört. Die Mutation rtN236T zeigt mit einer 4fachen Reduktion der Sensitivität gegenüber Tenofovir *in vitro* eine Kreuzresistenz. Die Patienten mit dieser Mutation zeigen klinisch jedoch ein signifikantes Ansprechen auf Tenofovir, was den Einsatz von Tenofovir bei einer ADV-Therapieresistenz rechtfertigen kann (Qi, Xiong et al. 2007). Die Studienlage ist jedoch nicht eindeutig und es wird über Kreuzresistenzen berichtet, weswegen eventuell zusätzlich zu Tenofovir ein Nukleosidanalogen gegeben werden sollte (Tan, Degertekin et al. 2008). Das Therapieansprechen ADV-resistenter HBV-Stämme auf Tenofovir lässt sich eventuell mit der Möglichkeit Tenofovir in einer

höheren Dosis als Adefovir einzusetzen erklären, da Tenofovir in geringerem Maße nephrotoxisch ist als Adefovir (Ratziu, Thibault et al. 2006; Cornberg, Protzer et al. 2007).

4.4.3 Einfluss weiterer HBV-Polymerasegenmutationen auf die Therapie mit Adefovir dipivoxil

Außer den bislang bekannten Mutationen rtN236T und rtA181V werden in der Literatur weitere Mutationen beschrieben, die mit einer ADV-Therapieresistenz bzw. mit einem reduzierten Ansprechen auf ADV assoziiert sein könnten. Bartholomeusz et al. fand in *in vitro* Untersuchungen einen Abfall der Sensitivität gegenüber ADV bei den Mutationen rtV84M und rtS85A (Bartholomeusz 2004). Borroto-Esoda et al. konnte die Mutationen rtV84M und rtS85A als Polymorphismen definieren, da beide Mutationen schon vor Beginn einer ADV-Therapie in der HBV-Polymerase zu identifizieren waren und nach einer Therapie von 48 Wochen kein Unterschied im Ansprechen festzustellen war. Die Mutation rtV84M wurde zudem in *in vitro* Untersuchungen untersucht, wobei die Empfindlichkeit gegenüber ADV unverändert blieb (Borroto-Esoda, Miller et al. 2007). Die Untersuchungen vorliegender Arbeit fanden ebenfalls keinen Zusammenhang der Mutationen rtV84M und rtS85A mit einem reduzierten Ansprechen auf ADV. Sie wurden bei keinem der Patienten mit Therapieversagen unter antiviraler Therapie mit ADV nachgewiesen.

Die Mutation rtN134D hat Westland et al. als häufig auftretende Mutation beschrieben. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutation rtN134D jedoch nicht überdurchschnittlich häufig (5,8 %) identifiziert. Jedoch fand Westland et al. keinen Häufigkeitsunterschied des Vorkommens der Mutation rtN134D unter ADV behandelten Patienten im Vergleich zu Placebo behandelten (Westland, Yang et al. 2003). Die genotypische Analyse dieser Arbeit untermauert Westlands Ergebnisse. Eine signifikante Korrelation

mit einem schlechten Ansprechen gegenüber ADV konnte nicht gezeigt werden ($p=0.069$).

Der Einfluss der Mutation rtA181T auf die antivirale Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV wird kontrovers diskutiert. Borroto-Esoda et al. fand ein gering reduziertes Ansprechen gegenüber einer ADV-Therapie in *in vitro* Experimenten ($<2\log$) (Borroto-Esoda, Miller et al. 2007), was sich mit den Aussagen des ADV Herstellers Gilead deckt, der eine 1,3-1,9fache Reduktion angibt (GileadSciences 2006). Im Gegensatz dazu konnte Yatsoji in *in vitro* Untersuchungen keinen Einfluß der Mutation rtA181T auf das Ansprechen gegenüber ADV feststellen (Hiromi 2006). In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte die Mutation A181T im ausgewerteten Patientenkollektiv viermal nachgewiesen werden. Eine Korrelation mit reduziertem Ansprechen gegenüber ADV konnte hier nicht gezeigt werden ($p=1,0$). Interessanterweise ist für die Mutation rtA181T aber unter anderem eine Reduktion der Suszeptibilität gegenüber einer Lamivudin- und Entecavirtherapie um das 8-12fache im Vergleich zu einem Wildtyp-Genom beschrieben worden (Qi, Xiong et al. 2007). Die Mutation rtA181T hat somit einen Einfluss auf die antivirale Therapie der chronischen HBV-Infektion, kann jedoch nicht als spezifische ADV-Resistenzmutation gewertet werden.

Die Mutation rtT184S, die nach der Studie von Moriconi das Ansprechen auf ADV beeinflussen soll, wurde in vorliegender Arbeit nicht nachgewiesen (Moriconi, Colombatto et al. 2007).

Die Mutation rtQ215S wird nach Ergebnissen einiger Studien während einer Lamivudin-Therapie selektioniert und reduziert nach einer Therapieumstellung von Lamivudin auf ADV das Ansprechen auf ADV. Zudem soll sie das Risiko für eine ADV-Resistenzentwicklung erhöhen (Angus, Vaughan et al. 2003; Gerolami, Bourliere et al. 2006; Villet, Pichoud et al. 2006). Moriconi et al. konnten in ihrer Studie jedoch keinen Einfluss der Mutation rtQ215S auf das ADV-Therapieansprechen feststellen (Moriconi, Colombatto et al. 2007). In Übereinstimmung mit Moriconi et al. konnte in den Untersuchungen der

vorliegenden Arbeit die Mutation rtQ215S nicht mit einer ADV-Resistenz in Verbindung gebracht werden ($p=0,327$).

Schildgen et al. beschrieben die Mutation rtl233V in Zusammenhang mit einem primären Nicht-Ansprechen auf ADV (Schildgen, Sirma et al. 2006), wobei Curtis diese Aussage in seiner 853 Patienten umfassenden Studie nicht bestätigen konnte (Curtis, Zhu et al. 2007). Curtis und Kollegen fand vier Patienten mit der Mutation rtl233V, jedoch sprachen alle vier Patienten auf die ADV-Therapie an. Zudem zeigten seine funktionellen Untersuchungen der rtl233V-Mutation ein volles Ansprechen auf die Behandlung mit ADV. Somit sprechen die Daten von Curtis und Kollegen eher gegen einen Zusammenhang dieser Mutation mit einer Resistenz gegenüber ADV. In den Proben der vorliegenden Arbeit war die Mutation rtl233V nicht nachweisbar.

Die in der D-Domäne lokalisierten Mutationen rtP237H, rtN238T/D konnten in vorliegender Untersuchung ebenfalls nicht bestätigt werden und stehen nicht in Einklang mit Ergebnissen von Bartholomeusz et al. (Bartholomeusz 2004). Die Mutation rtN238T/D war statistisch nicht mit einer Resistenz assoziiert ($p=1,0$).

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte von den bislang vermuteten Resistenzmutationen in den genotypischen Auswertungen keine der genannten Mutationen rtV84M, rtS85A, rtN134D, rtA181T, rtT184S, rtQ215S, rtl233V, rtP237H, rtN238T/D als Resistenzmutation bestätigt werden.

Die statistischen Arbeiten und Kalkulationen dieser Arbeit konnten neue Aminosäuremutationen zusätzlich zu den bereits publizierten Resistenzmutationen an den Positionen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128I/N ($p=0,035$), rtL231V ($p=0,015$) mit einem Therapieversagen gegenüber ADV in Verbindung bringen. Um die Relevanz der Mutationen rtA38E/T, rtT128I/N, rtL231V zu überprüfen, müssen diese Mutationen nun weiter phänotypischen Analysen zugeführt werden, um ihre klinische Relevanz eindeutig zu bestätigen.

4.4.4 *In vitro* Sensitivität der Mutation rtN248H gegenüber einer Behandlung mit Adefovir dipivoxil

Die Mutation rtN248H in der E-Domäne der HBV-Polymerase trat in den in dieser Arbeit untersuchten Proben sehr häufig auf (97/276, 35 %) und war positiv korreliert mit dem Transaminasewert ALT ($r=0,64$, $p<0,0001$). Weiter zeigten alle Patienten mit dieser Mutation ein suboptimales Ansprechen auf ADV. Daher wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dieser Mutation und dem schlechten Ansprechen auf ADV phänotypisch untersucht, wofür ein replikationskompetentes Plasmid mit der Punktmutation rtN248H konstruiert und in Zellkulturexperimenten funktionell untersucht wurde (Kap.3.2.3.3).

Die Ergebnisse der phänotypischen Assays belegten die Reduktion des Ansprechens auf ADV. Der EC_{50} -Wert stieg im Vergleich zum Wildtyp um das 4fache (Kap.3.2.3.3). Yang et al. hat die Mutation rtN248H als Polymorphismus beschrieben. Im Gegensatz dazu ist diese Mutation nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht als Polymorphismus einzustufen. Yang et al. wies für seine polymorphen Mutationen *in vitro* eine 0,3-1,3fache Reduktion nach (Yang, Westland et al. 2002). Der Wert aus dieser Arbeit liegt mit 4fach darüber. Die Mutation kann somit nach vorliegenden Ergebnissen als bedingte Resistenzmutation eingestuft werden, die das Ansprechen auf ADV beeinflussen kann.

Die Mutation rtE263D wurde mit 116/276 (42 %) sehr häufig identifiziert. Diese Mutation war jedoch in den statistischen Analysen nicht mit einer ADV-Resistenz korreliert ($p=0,68$). Dies weist eindeutig darauf hin, dass diese Mutation als Polymorphismus gewertet werden muss. Jedoch trat sie - wie in Kap. 3.1.3 Beschrieben - zu 71 % (82/116) in Kombination mit der Mutation rtN248H auf, was einen potentiellen Einfluss als kompensatorische Mutation vermuten lässt, da die Patienten mit der Doppelmutation rtE263D/rtN248H Therapieversagen zeigten. In weiteren phänotypischen Untersuchungen muss nun untersucht werden, ob die Doppelmutation rtE263D/rtN248H die Sensitivität

gegenüber ADV herabsetzt und die Replikationskompetenz dieser rtE263D/rtN248H HBV-Mutanten verbessert und somit als kompensatorische Mutation gewertet werden kann.

4.5 Ausblick

Mit „Molekularem Modelling“ kann versucht werden, eine mögliche Erklärung für das phänotypische Verhalten der Resistenzmutationen zu finden. „Molekulares Modelling“ stellt eine computerbasierte Methode dar, mit der die dreidimensionale Struktur von Proteinen dargestellt und computergesteuert manipuliert werden kann. Ein Modell der HBV-Polymerase wurde basierend auf der kristallinen Struktur des HIV Typ 1 und des Murinen Leukämievirus generiert (Das, Xiong et al. 2001). Aus Analysen des „Molekularen Modellings“ geht hervor, dass die Mutation rtN236T die Bindungsstelle für dNTPs innerhalb der Polymerase verändert, wodurch die Bindung des ADV abgeschwächt und die Affinität des natürlichen ATP erhöht wird. Diese Veränderung kann den Wirkungsverlust des ADV erklären (Yadav and Chu 2004). Die Mutation rtA181V vermindert durch eine allosterische Konformationsänderung im katalytischen Zentrum der Polymerase die Wirkung von ADV (Locarnini and Mason 2006). Bei der Interpretation potentieller neuer Resistenzmutationen, wie der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen potentiellen Resistenzmutationen, könnte von der Methode des „molekularen Modellings“ profitiert werden, um die Einflüsse der Mutationen auf mögliche Konformationsänderungen der Polymerase detaillierter zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Die HBV-Infektion zählt mit 400 Millionen chronisch infizierten Menschen zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Der therapeutische Einsatz der Immunmodulatoren Interferon- α (IFN- α) und pegyliertes Interferon- α (PEG-IFN- α) sowie der antiviralen Medikamente, den Nukleos/tidanaloga ist durch ein breites Nebenwirkungsspektrum, bzw. die Selektion von Resistenzmutationen limitiert. Da die Selektion von Resistenzmutationen zur Progression der Lebererkrankung führen kann, hat die Untersuchung und Charakterisierung der Selektion von Resistenzmutationen für das antivirale Therapiemanagement der chronischen HBV-Infektion weitreichende klinische Konsequenzen. Dementsprechend sollte im Rahmen dieser Arbeit das Vorkommen und die Selektion von Resistenzmutationen gegenüber Nukleos/tidanaloga, insbesondere dem Nukleotidanalogen Adefovir dipivoxil (Hepsera[®]) (ADV) untersucht werden. Unter ADV-Monotherapie ist die Selektion von bislang zwei publizierten Mutationen (rtN236T und rtA181V) bekannt.

Für die Untersuchung eines ADV-induzierten Resistenzprofils wurde im Rahmen dieser Arbeit HBV-DNA aus Seren von 276 Patienten eines ausgewählten Patientenkollektivs isoliert und molekulargenetisch analysiert. Die Mutationsanalyse erfolgte durch Sequenzierung der mittels PCR amplifizierten reverse Transkriptasedomänen, gefolgt von einer Genotypisierung. Die identifizierten potentiellen Mutationen wurden über gerichtete Mutagenese in replikationskompetente HBV-Plasmide kloniert und diese in funktionellen Zellkulturexperimenten auf ihre Suszeptibilität gegenüber ADV untersucht. Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm „SPSS“ durchgeführt.

In den Analysen fanden sich 67 % häufiger HBeAg-positive als HBeAg-negative Infektionen. Weiter konnte gezeigt werden, dass der HBV-Genotyp keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber ADV zeigt, da keine Korrelation zwischen einzelnen Mutationen und einem spezifischen HBV-

Genotyp festzustellen war. Die genotypische Mutationsanalyse ergab, wie bei der hohen Mutationsrate des HBV zu erwarten, zufällig verteilte Mutationen. Einige Mutationen traten gehäuft auf und waren nicht mit einer ADV-Resistenz assoziiert (rtL122F ($p=0,684$), rtN124H ($p=0,102$), rtP130Q ($p=0,103$) und rtD131N ($p=0,064$)). Sie stellen somit, wie auch in der Literatur beschrieben, Polymorphismen dar. Die Korrelation einzelner Mutationen mit einer Therapieresistenz (definiert als 1 log Anstieg der HBV DNA) ergab zusätzlich zu den bereits publizierten Mutationen rtN236T und rtA181V für Mutationen an den Positionen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128I/N ($p=0,035$) und rtL231V ($p=0,015$) eine signifikante Korrelation mit einer Therapieresistenz. Zudem zeigte die Mutation rtN248H eine signifikante Korrelation mit einem erhöhten Transaminasewert ALT ($r=0,65$; $p<0,001$). Die isolierte Mutation rtE263D wurde mit 116/276 (42 %) sehr häufig identifiziert, war aber nicht mit einer ADV-Resistenz korreliert ($p=0,68$). Ihre häufige Kombination mit der Mutation rtN248H (71 %) lässt einen Einfluss als kompensatorische Mutation vermuten. Die aktuell diskutierten ADV-Resistenzmutationen, wie rtV84M, rtS85A, rtQ215S, rt233V und rtP237H konnten in dieser Arbeit nicht als Resistenzmutationen bestätigt werden.

In den funktionellen Zellkulturexperimenten zeigte die Mutation rtN236T ($EC_{50}=20\mu\text{M}$) mit einer Erhöhung der EC_{50} um mehr als 6,7fache im Vergleich zum Wildtyp ($EC_{50}=3\mu\text{M}$) keine Suszeptibilität gegenüber ADV. Die Mutation rtN248H zeigte eine moderate 4fache Erhöhung der EC_{50} ($EC_{50}=12\mu\text{M}$) unter ADV-Behandlung im Vergleich zum Wildtypgenom.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass neben den bereits beschriebenen Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T weitere Mutationen im HBV-Poymerasegen selektiert werden, die für eine verminderte Sensitivität gegenüber der ADV-Therapie verantwortlich sein können. *In vitro* Studien belegen, dass bei ADV-Therapieversagen eine Therapie mit anderen Nukleos/tidanaloga Entecavir, Lamivudin und Tenofovir wirksam sein kann. Weitere klinische und molekulargenetische Daten zu Resistenzmechanismen sind dazu aber notwendig.

6 Literaturverzeichnis

Allen, M. I., M. Deslauriers, et al. (1998). "Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group." Hepatology 27(6): 1670-7.

Angus, P., R. Vaughan, et al. (2003). "Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase." Gastroenterology 125(2): 292-297.

Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann, et al. (1990). "The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation." J.Virol. 64(11): 5324-5332.

Bartholomeusz, A., Locarnini, S., Ayres, A., Thompson, G. (2004). "Molecular modelling of hepatitis B virus polymerase and adefovir resistance identifies three clusters of mutations." Hepatology 40(246A).

Beasley, R. P., L. Y. Hwang, et al. (1981). "Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan." Lancet 2(8256): 1129-1133.

Blumberg, B. S., H. J. Alter, et al. (1965). "A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA." JAMA 191: 541-546.

Bock, C. (2006). "HBV-Resistenz: Aus Sicht des Virologen." Hepatitis and More 2: 22-25.

Bock, C. T., P. Schranz, et al. (1994). "Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell." Virus Genes 8(3): 215-229.

Bock, C. T., S. Schwinn, et al. (2001). "Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome." Journal of Molecular Biology 307(1): 183-196.

Borroto-Esoda, K., M. D. Miller, et al. (2007). "Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials." J Hepatol 47(4): 492-8.

Brunelle, M. N., A. C. Jacquard, et al. (2005). "Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir." Hepatology 41(6): 1391-1398.

Chien, R. N., C. T. Yeh, et al. (2003). "Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy." Hepatology 38(5): 1267-1273.

Chisari, F. V. (2000). "Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B." Am.J.Pathol. 156(4): 1117-1132.

Chu, C. J., E. B. Keeffe, et al. (2003). "Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States." Hepatology 38(3): 619-628.

Chu, C. M., S. J. Hung, et al. (2004). "Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels." Am.J.Med. 116(12): 829-834.

Cornberg, M., U. Protzer, et al. (2007). "Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-B-virus-(HBV)-infection: upgrade of the guideline, AWMF-Register 021/011." Zeitschrift für Gastroenterologie 45(6): 525-574.

Craxi, A., D. Di Bona, et al. (2003). "Interferon-alpha for HBeAg-positive chronic hepatitis B." J.Hepatol. 39 Suppl 1: S99-105.

Curtis, M., Y. Zhu, et al. (2007). "Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir." J Infect Dis 196(10): 1483-6.

Dane, D. S., C. H. Cameron, et al. (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." Lancet 1(7649): 695-698.

Das, K., X. Xiong, et al. (2001). "Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC)." J.Virool. 75(10): 4771-4779.

De Clercq, E. (2004). "Antivirals and antiviral strategies." Nat.Rev.Microbiol. 2(9): 704-720.

Delaney, W. E. (2007). "Progress in the treatment of chronic hepatitis B: long-term experience with adefovir dipivoxil." J.Antimicrob.Chemother. 59(5): 827-832.

Delaney, W. E., A. S. Ray, et al. (2006). "Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus." Antimicrob.Agents Chemother. 50(7): 2471-2477.

Delaney, W. E., H. Yang, et al. (2003). "The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro." J.Virool. 77(21): 11833-11841.

Erhardt, A., D. Blondin, et al. (2005). "Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D." Gut 54(7): 1009-1013.

Ferir, G., S. Kaptein, et al. (2008). "Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: the past, the present and the future." Reviews in Medical Virology 18(1): 19-34.

Fung, S. K., P. Andreone, et al. (2005). "Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation." Journal of Hepatology 43(6): 937-943.

Funk, M. L., D. M. Rosenberg, et al. (2002). "World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants." J Viral Hepat 9(1): 52-61.

Ganem, D. and A. M. Prince (2004). "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences." N.Engl.J.Med. 350(11): 1118-1129.

Ganem, D. and H. E. Varmus (1987). "The molecular biology of the hepatitis B viruses." Annu.Rev.Biochem. 56: 651-693.

Gerolami, R., M. Bourliere, et al. (2006). "Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases." Antivir Ther 11(8): 1103-6.

GileadSciences (2006). "Hepsera (adefovir dipivoxil) Tablets, US Prescribing Information." Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA.

Girones, R. and R. H. Miller (1989). "Mutation rate of the hepadnavirus genome." Virology 170(2): 595-597.

Hadziyannis, S. J. and G. V. Papatheodoridis (2003). "Treatment of HBeAg negative chronic hepatitis B with new drugs (adefovir and others)." J.Hepatol. 39 Suppl 1: S172-S176.

Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, et al. (2005). "Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B." N.Engl.J.Med. 352(26): 2673-2681.

Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, et al. (2006). "Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years." Gastroenterology 131(6): 1743-1751.

Herold, G. (2007). "Innere Medizin." 475-477.

Hiroimi, Y. (2006). Emergence of a Novel Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Variant with a Substitution Outside the YMDD Motif[down-pointing small open triangle]. Antimicrob Agents Chemother. 50(11): 3867-3874.

Kock, J. and H. J. Schlicht (1993). "Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity." J.Virol. 67(8): 4867-4874.

Kondili, L. A., H. Osman, et al. (2004). "The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases)." J.Viral Hepat. 11(5): 427-431.

Kumar, M., S. Satapathy, et al. (2007). "A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B." Hepatology 45(1): 97-101.

Lai, C. L., J. Dienstag, et al. (2003). "Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B." Clin Infect Dis 36(6): 687-96.

Lampertico, P., M. Vigano, et al. (2007). "Low resistance to adefovir combined with lamivudine: a 3-year study of 145 lamivudine-resistant hepatitis B patients." Gastroenterology 133(5): 1445-1451.

Landers, T. A., H. B. Greenberg, et al. (1977). "Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction." J.Virol. 23(2): 368-376.

Lee, H. G., J. S. Lim, et al. (1997). "Peptide-specific CTL induction in HBV-seropositive PBMC by stimulation with peptides in vitro: novel epitopes identified from chronic carriers." Virus Research 50(2): 185-194.

Lee, W. M. (1997). "Medical progress - Hepatitis B virus infection." New England Journal of Medicine 337(24): 1733-1745.

- Liu, C. J., J. H. Kao, et al. (2005). "Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes." Liver Int 25(6): 1097-107.
- Locarnini, S. (2005). "Molecular virology and the development of resistant mutants: Implications for therapy." Seminars in Liver Disease 25: 9-19.
- Locarnini, S., A. Hatzakis, et al. (2004). "Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B." Antivir.Ther. 9(5): 679-693.
- Locarnini, S. and W. S. Mason (2006). "Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance." J.Hepatol. 44(2): 422-431.
- MacCallum, F. O., A. M. McFarlan, et al. (1951). "Infective hepatitis; studies in East Anglia during the period 1943-47." Spec.Rep.Ser.Med.Res.Counc.(G.B) 273: 1-144.
- Manesis, E. K. and S. J. Hadziyannis (2001). "Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B." Gastroenterology 121(1): 101-109.
- Marcellin, P., T. Chang, et al. (2005). "Increasing serologic, virologic and biochemical response over time to adefovir dipivoxil (ADV) 10 Mg in HBeAg plus chronic hepatitis B (CHB) patients." Gastroenterology 128(4): A741-A742.
- Marcellin, P., T. T. Chang, et al. (2003). "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B." N.Engl.J.Med. 348(9): 808-816.
- Merta, A., I. Votruba, et al. (1992). "Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP(dAMP) kinase from L1210 cells." Biochem.Pharmacol. 44(10): 2067-2077.
- Milich, D. R., F. Schodel, et al. (1995). "Characterization of self-reactive T cells that evade tolerance in hepatitis B e antigen transgenic mice." Eur.J.Immunol. 25(6): 1663-1672.
- Moriconi, F., P. Colombatto, et al. (2007). "Emergence of hepatitis B virus quasispecies with lower susceptibility to nucleos(t)ide analogues during lamivudine treatment." J Antimicrob Chemother 60(2): 341-9.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, et al. (1984). "Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium." Gann 75(2): 151-158.
- Nassal, M. and H. Schaller (1993). "Hepatitis B virus replication." Trends Microbiol. 1(6): 221-228.
- Nassal, M. and H. Schaller (1996). "Hepatitis B virus replication--an update." J.Viral Hepat. 3(5): 217-226.
- Niederau, C. (2007). "[Epidemiology of hepatitis B in Germany]." Med Klin (Munich) 102(5): 351-7.
- Qi, X., S. Xiong, et al. (2007). "In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents." Antivir.Ther. 12(3): 355-362.

- Ratziu, V., V. Thibault, et al. (2006). "Successful rescue therapy with tenofovir in a patient with hepatic decompensation and adefovir resistant HBV mutant." Comp Hepatol 5: 1.
- RKI (2006). "Virushepatitis B, C und D: Situationsbericht 2005." Epidemiologisches Bulletin: pp. 399–407.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Schildgen, O., H. Sirma, et al. (2006). "Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir." N.Engl.J.Med. 354(17): 1807-1812.
- Seeger, C., D. Ganem, et al. (1986). "Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy." Science 232(4749): 477-484.
- Shaw, T., A. Bartholomeusz, et al. (2006). "HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation." J.Hepatol. 44(3): 593-606.
- Standring, D. N., J. H. Ou, et al. (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(22): 8405-8409.
- Stuyver, L., S. De Gendt, et al. (2000). "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness." J.Gen.Virol. 81(Pt 1): 67-74.
- Stuyver, L. J., S. A. Locarnini, et al. (2001). "Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region." Hepatology 33(3): 751-757.
- Tan, J., B. Degertekin, et al. (2008). "Tenofovir monotherapy is effective in hepatitis B patients with antiviral treatment failure to adefovir in the absence of adefovir-resistant mutations." J Hepatol 48(3): 391-8.
- Tillmann, H. L. (2007). "Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection." World Journal of Gastroenterology 13(1): 125-140.
- Villeneuve, J. P., D. Durantel, et al. (2003). "Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient." J.Hepatol. 39(6): 1085-1089.
- Villet, S., C. Pichoud, et al. (2006). "Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient." Gastroenterology 131(4): 1253-61.
- Wai, C. T., C. J. Chu, et al. (2002). "HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C." Hepatology 36(6): 1425-1430.
- Westland, C., W. Delaney, et al. (2003). "Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil1." Gastroenterology 125(1): 107-116.
- Westland, C. E., H. Yang, et al. (2003). "Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B." Hepatology 38(1): 96-103.

- Wiegand, J., D. Hasenclever, et al. (2008). "Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence." Antivir Ther 13(2): 211-20.
- Wigler, M., S. Silverstein, et al. (1977). "Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells." Cell 11(1): 223-32.
- Yadav, V. and C. K. Chu (2004). "Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study." Bioorg Med Chem Lett 14(16): 4313-7.
- Yang, H., C. E. Westland, et al. (2002). "Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks." Hepatology 36(2): 464-473.
- Yim, H. J. and A. S. Lok (2006). "Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005." Hepatology 43(2 Suppl 1): S173-S181.
- Yuen, M. F., H. J. Yuan, et al. (2005). "Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications." Gut 54(11): 1610-1614.
- Zeng, A. Z., H. Deng, et al. (2008). "[Comparison of antiviral responses to adefovir dipivoxil therapy of genotype B and genotype C HBV infected patients]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 16(6): 412-5.
- Zollner, B., J. Petersen, et al. (2004). "Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D." Hepatology 39(1): 42-50.
- Zoulim, F. (2004). "Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection." Antiviral Res. 64(1): 1-15.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während des Entstehens dieser Arbeit geholfen haben.

Herrn PD Dr. rer. nat. C.-Thomas Bock danke ich für die Vergabe und die sehr gute Betreuung dieser Doktorarbeit, sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Ich möchte Herrn Professor Dr. med. Reinhard Kandolf für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danken. Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. med. Hand Ludger Tillmann für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein Dank gilt auch Dr. rer. nat. Bernd Köberlein, der mir mit der Betreuung des Projekts im Labor methodisch und inhaltlich sehr geholfen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Anja Düchting und Dr. rer. nat. Susanne Aberle, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, ebenso bei Dr. rer. nat. Birgit Haack und Heike Kaiser, die mich immer unterstützt haben und nie müde wurden, meine vielen Fragen zu beantworten.

Weiter gilt mein Dank allen weiteren MitarbeiterInnen der molekularen Pathologie und den MitarbeiterInnen der molekularpathologischen Diagnostik (Gerd, Gudrun, Isabell, Karen, Martina, Nora, Patricia, Sandra, Silke).

Mein Dank geht auch an das Evangelische Studienwerk e.V. Villigst für seine finanzielle Unterstützung, die Beratung und Begleitung. Hier möchte ich mich besonders meinem Vertrauensdozenten Dr. Eberhard Müller danken.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meinen Freunden und meiner Familie dafür danken, dass sie mit mir die Höhen und Tiefen während des Entstehens dieser Arbeit geduldig durchlebt haben und ich mich auf ihre Unterstützung verlassen kann.

Lebenslauf

Name: Christine Walker

Geburtsdatum/ort: 15.05.1984 in Filderstadt

Studium

- Seit SS 2004, Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- 29.März 2006; Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- SS 2007, Forschungssemester für die Dissertation
- WS 08/09, Auslandssemester in den USA, Brown Medical School, Providence-RI
- SS 2010/ WS 2010/11, Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Freiburg
- 17.Mai 2011, Ärztliche Prüfung

Zeit zwischen Abitur und Studium

Auslandsaufenthalt in Mexiko und Guatemala zum Erlernen der spanischen Sprache und für ein Pflegepraktikum

Schulzeit

- 1990-1992 Grundschule Ergenzingen
- 1992-1994 Grundschule Derendingen
- 1994-2003 Uhland-Gymnasium Tübingen, Abitur, 27.Juni 2003

Publikation

Thomas Bock, **Christine Walker**, Bernd Koeberlein, Conrad Fischer, Reinhard Kandolf, Joseph Torresi (2008). "Characterization of hepatitis B virus polymerase mutations detected during antiviral treatment with Adefovir dipivoxil (ADV)." *Hepatology* 46: 658A