

Manifestation von Resistenzmutationen auf  
Hepatitis-B-Virus RNA-Replikationsintermediaten  
bei der Nukleos(t)id-Analoga-Therapie  
chronischer Hepatitis-B-Patienten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolf, Martin Christoph

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C.-T. Bock
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. P. Berg

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	9
1.1. Die Hepatitis-B-Virusinfektion .....	9
1.1.1. Historische und epidemiologische Bedeutung .....	9
1.1.2. Taxonomie des Hepatitis-B-Virus .....	10
1.1.3. Genotypen des humanen Hepatitis-B-Virus.....	11
1.1.4. Struktur des Hepatitis-B-Virus.....	11
1.1.5. Genom des Hepatitis-B-Virus .....	13
1.1.6. Expression viraler Proteine und Struktur der viralen Polymerase des Hepatitis-B-Virus.....	14
1.1.7. Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus.....	17
1.2. Immunpathogenese der Hepatitis-B-Virusinfektion .....	19
1.3. Infektion und Verlaufsformen der Hepatitis B.....	20
1.3.1. Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus.....	20
1.3.2. Akute und chronische Hepatitis B .....	21
1.4. Diagnostik der Hepatitis B .....	23
1.4.1. Serologische Diagnostik .....	23
1.4.2. Phänotypische und genotypische Diagnostik .....	24
1.5. Therapie der Hepatitis B .....	25
1.5.1. Überblick.....	25
1.5.2. Impfprophylaxe .....	26
1.5.3. Therapie der akuten Hepatitis B .....	26
1.5.4. Therapie der chronischen Hepatitis B.....	27
1.5.4.1. Interferone.....	28
1.5.4.2. Nukleos(t)id-Analoga.....	29
1.5.5. Therapie-Monitoring und Behandlungsendpunkte .....	31
1.6. Resistenzmutationen unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie mit Lamivudin und Adefovir .....	32
1.6.1. Überblick.....	32
1.6.2. Lokalisation der Lamivudin- und Adefovir-Resistenzmutationen in der Reversen-Transkriptase-Region der Hepatitis-B-Virus-Polymerase ...	33

1.7.	Neue diagnostische Ansätze zur Beurteilung der Hepatitis-B-Virusaktivität und des Resistenzverhaltens.....	36
1.7.1.	HBV-cccDNA als Indikator der Virus-Reaktivierung.....	36
1.7.2.	HBV-RNA im Serum als potentieller diagnostischer Marker .....	37
1.8.	Zielsetzung dieser Arbeit.....	39
2.	Material und Methoden.....	40
2.1.	Material .....	40
2.1.1.	Lösungen und Puffer .....	40
2.1.2.	Kommerzielle Kits .....	40
2.1.3.	Enzyme.....	41
2.1.4.	DNA-Standards.....	41
2.1.5.	Verbrauchsmaterialien .....	41
2.1.6.	Geräte- und Zubehör .....	41
2.1.7.	Oligonukleotide .....	42
2.2.	Methoden .....	44
2.2.1.	Studiendesign und Datenerhebung .....	44
2.2.2.	HBV-DNA-Extraktion und quantitative PCR.....	44
2.2.3.	Extraktion von HBV-RNA aus Blutserum .....	45
2.2.3.1.	DNase- Verdau .....	46
2.2.4.	HBV-RACE-PCR zum selektiven Nachweis der HBV-RNA .....	47
2.2.4.1.	Überblick .....	47
2.2.4.2.	cDNA-Synthese für HBV-RACE-PCR .....	47
2.2.4.3.	RNase-Verdau .....	48
2.2.4.4.	Spezifität des Lock-Docking-Primer .....	48
2.2.4.5.	Nested PCR nach der HBV-RACE-Methode.....	49
2.2.4.6.	Gel-Elektrophorese der HBV-PCR-Produkte.....	50
2.2.5.	Direkte Sequenzierung .....	51
2.2.6.	Mutationsanalyse.....	53
3.	Ergebnisse .....	54
3.1.	Genotypische Analyse der Selektion von Resistenzmutationen des Hepatitis-B-Virus.....	55

3.1.1. Analyse von klinischen Datensätzen bei vollständig anonymisierten HBV-Isolaten .....	55
3.1.2. Genotypische Analyse der Reversen-Transkriptase-Region des Hepatitis-B-Virus .....	57
3.1.3. Analyse der Genotypen-Prävalenz bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B.....	58
3.1.4. Analyse des Effektes der Nukleos(t)id-Analoga-Therapie auf virologische und biochemische Resistenzparameter .....	60
3.2. Etablierung einer HBV-Polymerase spezifischen RACE-PCR (HPoRACE-PCR) zum Nachweis von HBV-RNA-Molekülen .....	63
3.2.1. Überblick.....	63
3.2.2. Adaption der RACE-PCR Technik .....	63
3.2.3. Anwendung der neu etablierten HPoRACE-PCR auf das untersuchte Patientenkollektiv.....	67
3.2.4. Korrelation der Hepatitis-B-Virus-RNA mit virologischen und biochemischen Resistenzparametern .....	68
3.3. Mutationsanalyse im YMDD-Motiv der Hepatitis-B-Virus-Polymerase von Replikationsintermediaten unter Lamivudin-Therapie .....	69
3.3.1. Molekulargenetische Analyse des YMDD-Motivs auf Ebene der Hepatitis-B-Virus-DNA.....	69
3.3.2. Molekulargenetische Analyse des YMDD-Motivs auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate.....	71
3.3.2.1. Überblick .....	71
3.3.2.2. Sequenzanalyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate .....	73
4. Diskussion.....	76
4.1. Analyse des Hepatitis-B-Virus-Genotyps bei Patienten unter Nukleos(t)id-Analog-Therapie .....	77
4.1.1. Geographische Prävalenz .....	77
4.1.2. Einfluss des Hepatitis-B-Virus-Genotyps auf Therapieansprechen und Resistenzentwicklung.....	77
4.2. Antivirale Therapie der chronischen Hepatitis B mit Nukleos(t)id-Analoga.....	79

4.2.1.	Resistenzentwicklung unter Lamivudin- und Adefovir-Therapie ...	79
4.2.2.	Vergleich der antiviralen Effektivität zwischen Lamivudin- und Adefovir-Therapie.....	80
4.3.	Charakterisierung von HBV-RNA-Replikations-intermediaten im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B.....	82
4.3.1.	Methodische Herausforderungen beim Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten .....	82
4.3.2.	Auswirkung der Virusaktivität unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie auf den Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediate.....	84
4.3.3.	Korrelation der HBV-DNA-Konzentration mit dem Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten.....	85
4.3.4.	Mutationsanalyse im YMDD-Motiv der HBV-RNA-Replikationsintermediate und Bedeutung für die Nukleosid-Therapie mit Lamivudin.....	86
4.4.	Schlussfolgerung.....	88
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Literaturverzeichnis .....	91
7.	Erklärungen zum Eigenanteil .....	100
	Danksagung .....	100

## Abkürzungsverzeichnis

ADV	Adefovir
ALT	Alanin Aminotransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cccDNA	covalently closed, circle DNA
CCD	Charge Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CHB	chronische Hepatitis B
DHBV	duck hepatitis B virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR 1/2	direct repeat 1/2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
ETV	Entecavir
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSHV	ground squirrel hepatitis virus
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B early Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HHBV	heron hepatitis B virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IC	inhibitory concentration
IFN	Interferon
INNO-LiPA	Innogenetics line probe assay
IU	international Unit
LAM	Lamivudin

mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRTI	Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NTP	Nukleotriphosphat
nt	Nukleotid
ORF	open reading frame
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PRE	posttranscriptional regulatory elements
pgRNA	prägenomische RNA
mRNA	messenger RNA
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
rc-DNA	relaxed circle DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseH	Ribonuklease H
RPM	round per minute
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standard Deviation
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBV	Telbivudin
TDF	Tenofovir
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TP	terminales Protein
WHO	World Health Organisation
WHV	woodchuck hepatitis virus
YMDD	Thyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Hepatitis-B-Virusinfektion

### 1.1.1. Historische und epidemiologische Bedeutung

Die Hepatitis als Krankheitsentität wurde schon lange vor Entdeckung des Hepatitis-B-Virus (HBV) beschrieben. Historisch lassen sich dokumentierte Krankheitsfälle mehrere Jahrhunderte zurückverfolgen. 1947 stellte der britische Arzt F.O. MacCallum die Hypothese einer viralen Infektion als Ursache der Hepatitis vor. Ihm war während einer Studie mit einem aus menschlichem Blutserum hergestellten Gelbfieber-Impfstoff aufgefallen, dass die Probanden im Verlauf eine akute Hepatitis entwickelten (MacCallum, et al. 1951). Im Jahr 1965 entdeckte B. Blumberg im Serum eines australischen Ureinwohners ein bis dato unbekanntes Antigen. Die Zuordnung des Oberflächen-Antigens (HBs-Ag) als Bestandteil des HBV fiel zunächst schwer. Primär wurde ein Zusammenhang mit Leukämie vermutet (Blumberg, Alter und Visnich 1965), später mit dem Down-Syndrom (Blumberg, Gerstley, et al. 1967). Erst drei Jahre später konnte man das Oberflächen-Antigen eindeutig dem HBV zuordnen (Prince 1968). 1970 wurde das vollständige Hepatitis-B-Virus aus Patientenserum isoliert und von der World Health Organisation (WHO) registriert (Dane, Cameron und Briggs 1970). Mit dem Nachweis neutralisierender Antikörpern gegen das HBsAg begannen 1980 umfangreiche Impfstudien (Szmuness, et al. 1980).

Zurzeit ist die Infektion mit dem HBV eine der häufigsten Virusinfektionen weltweit. Schätzungsweise zwei Milliarden Menschen hatten mit dem HBV Kontakt, mehr als 240 Millionen davon sind chronisch infiziert. Jährlich sterben ca. 600.000 Menschen aufgrund akuter oder chronischer Folgeerscheinungen der Infektion (WHO 2012). Insgesamt steht die Hepatitis-B-Virusinfektion somit an fünfter Stelle der Todesursachen durch Infektionserkrankungen. Die Prävalenz von HBV ist geographisch unterschiedlich und variiert zwischen 0,1 und 20%. Regionen mit hoher Prävalenz sind Südostasien, China und Afrika mit ca. 8% chronisch HBV-Infizierten, wohingegen Regionen wie Nordamerika,

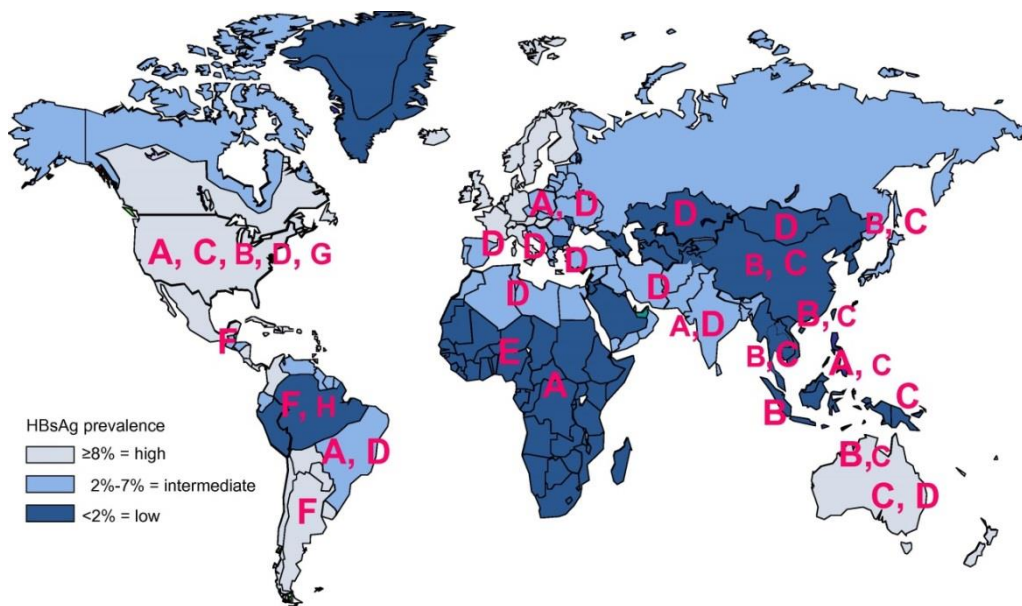
Westeuropa oder Australien mit einer Prävalenz von ca. 2% deutlich weniger chronisch HBV-Infizierte Patienten aufweisen (Previsani 2002). In Ländern mit großflächig angelegten Impfprogrammen, wie in den USA oder in Deutschland, ist ein Rückgang der Inzidenzrate zu beobachten (Poethko-Muller, Kuhnert und Schlaud 2007) (Rantala und van der Laar 2008). Die Inzidenzrate für Deutschland lag 2011 bei 1,4 für Männer und 0,6 für Frauen pro 100 000 Einwohner. Auch aufgrund der Impfpflicht für Neugeborene, zeigte sich von 2001 bis 2009 ein Rückgang der an das Robert Koch-Institut übermittelten Fälle. Seit 2009 stagniert die Zahl der HBV-Neuinfektionen bei ca. 1900 pro Jahr (Robert Koch Institut 2011). Im Gegensatz zu den rückläufigen Inzidenzraten steigt der Anteil der durch das HBV verursachten schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose und Leberzellkarzinom. Dieser Effekt ist jedoch am ehesten auf eine sensitivere Diagnostik und eine bessere Dokumentation zurückzuführen (Gomaa, et al. 2008).

### **1.1.2. Taxonomie des Hepatitis-B-Virus**

Das Hepatitis-B-Virus gehört zur Gruppe der Hepadna-Viren. Hepadna-Viren zeichnen sich durch einen starken Hepatotropismus (Wortteil „Hepa-“= lat. für Leber) aus und gehören zu der Gruppe der DNA-Viren (Wortteil „-dna“). Die Viren der Hepadna-Familie sind nicht nur humanpathogen, sondern können auch bei anderen Spezies nachgewiesen werden (Robinson 1980). Entsprechend werden die Hepadna-Viren in Orthohepadnaviren und Avihepadnaviren eingeteilt. Zu der Gruppe der Orthohepadnaviren gehört außer dem humanen Hepatitis-B-Virus das „ground squirrel hepatitis virus“ (GSHV und ASHV), welches das Erdhörnchen und das „woodchuck hepatitis B virus“ (WHV), welches das Waldmurmeltier befällt (Marion, Oshiro und Regnery 1980) (Summers, Smolec und Snyder 1978). Die Avihepadnaviren beinhalten ausschließlich Hepatitisviren, die bei Vögeln vorkommen. So findet sich bei der Ente das „duck hepatitis B virus“ (DHBV) und beim Graureiher das „heron hepatitis B virus“ (HHBV) (Mason, Seal und Summers 1980) (Sprengel, Kaleta und Will 1988).

### 1.1.3. Genotypen des humanen Hepatitis-B-Virus

Das humane Hepatitis-B-Virus ist in acht Genotypen A-H aufgegliedert. Unter diesen Genotypen besteht eine Sequenzdifferenz von 8-17% (Norder, Courouce und Magnius 1994). Des Weiteren ist eine Unterteilung in acht HBV-Subtypen möglich - hier bestehen Sequenzdifferenzen zwischen 4-8%. Epidemiologisch zeigt sich ein geographisches Verteilungsmuster (siehe **Abb. 1**). Genotyp A ist am häufigsten in Nordeuropa, sowie den USA zu finden. Die Genotypen B und C treten gehäuft in Asien auf. Genotyp D zeigt sich vor allem bei Patienten aus dem Mittelmeerraum, Mittleren Osten und Indien. In Zentral- und Osteuropa sind die Genotypen A und D zu ungefähr gleichen Anteilen vertreten (42% und 48%), die Genotypen B, C, E, F und H sind selten. In Deutschland kommt am häufigsten Genotyp D (58%), gefolgt von Genotyp A vor (32%) (Deterding, et al. 2008).



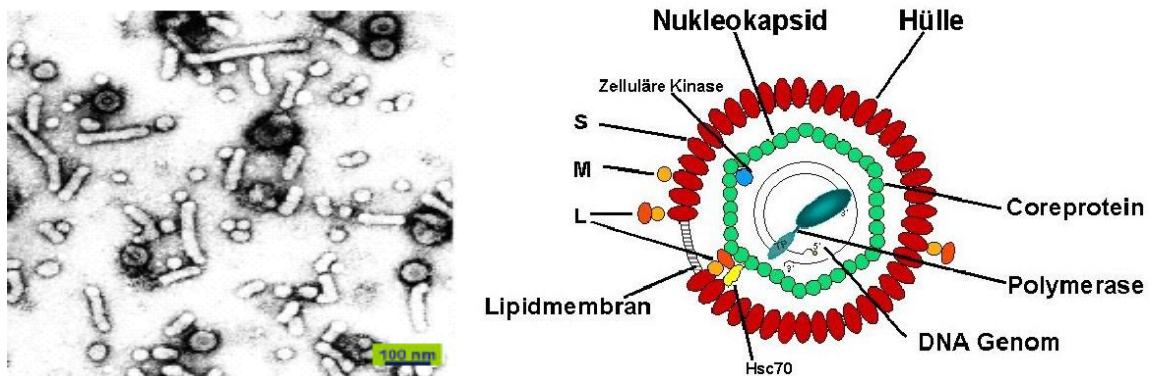
**Abb. 1: Geographische Karte mit Häufigkeit der HBV-Infektion (HBsAg-Prävalenz) und regional vorherrschendem HBV-Genotyp.** Modifiziert nach Kurbanov (S. J. Hadziyannis 2013).

### 1.1.4. Struktur des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus liegt als kompletter, sphärischer Partikel mit einem Durchmesser von 45nm vor. Nach seinem Entdecker wird es Dane-Partikel

genannt (Dane, Cameron und Briggs 1970). Es beinhaltet ein zentrales ikosaedrisches Nukleokapsid, das HB-Core Antigen (HBcAg) mit einem Durchmesser von 34nm. Das Virus besitzt mit ca. 3,2 kbp. das kleinste Genom aller humanpathogenen Viren. Im Inneren des Kapsids befindet sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom und die kovalent an das Genom gebundene virale Polymerase (Kaplan, Greenman und al. 1973) (Gerlich und Robinson 1980). Die Hülle, die das Kapsid umgibt, ist 7nm dick und besteht aus zellulären und viralen Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden (siehe **Abb. 2**). Sie wird auch Surface- oder HBs-Antigen (HBsAg) genannt. Die Oberflächenproteine liegen in drei unterschiedlichen Größen vor. Das LHBs (Größenbezeichnung „Large“) umfasst die S-Domäne, PräS2 und PräS1-Domäne. Das MHBs (Größenbezeichnung „Middle“) beinhaltet die S- und PräS2-Domäne und das SHBs (Größenbezeichnung „Small“) die S-Domäne (Stibbe und Gerlich 1982). Im Blut zirkuliert zudem eine bedeutende Menge an HBsAg in Form von Filamenten. Das Verhältnis von HBsAg als Filament zum kompletten Partikel liegt bei 10.000:1.

Während der Replikation wird das HBe- Antigen (HBeAg) als ein weiteres Virusprotein in die Blutbahn abgegeben. Es ist die lösliche Form des HBV-Core Proteins, über dessen Funktion bislang wenig bekannt ist.



**Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Dane-Partikel und filamentöse Partikel, aus dem Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten (links).** (Bock und Zentgraf, 1992). Rechts ist der schematische Aufbau eines Dane-Partikels dargestellt. Von außen nach innen zeigt sich die Membranhülle mit eingelagerten großen, mittleren- und kleinen (L, M und S) Oberflächenantigenen. Das Nukleokapsid bestehend aus dem HBV-Coreprotein mit zellulärer Protein-Kinase C und dem Chaperon Hsc 70 und zentral das partiell doppelsträngige DNA-Genom mit viraler Polymerase (entnommen aus Vogel 2004).

### 1.1.5. Genom des Hepatitis-B-Virus

Das HBV-Genom ist ca. 3,2 kbp groß. Die Größe variiert leicht in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps. Das Genom liegt im Kapsid als zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA vor und besteht aus einem unvollständigen Plusstrang mit einer variablen Länge und einem vollständigen Minusstrang mit konstanter Länge (Lutwick und Robinson 1977). An beiden Strängen zeigt sich im Bereich des 5'-Ende eine 11 Nukleotide lange direkte Sequenzwiederholung („direct repeat“; DR1/DR2), die im Rahmen der Replikation (siehe Kap. 1.1.7) eine wichtige Funktion übernimmt (Seeger, Ganem und al. 1986).

Die Länge des Plusstrangs (+) beträgt zwischen 1000 und 2500 Nukleotide. Das 5'-Ende ist definiert durch eine Cap-Struktur, das 3'-Ende ist variabel (Seeger, Ganem und al. 1986). Am 5'-Ende des Plusstrangs bleibt nach der viralen DNA-Synthese ein kurzer, von der prägenomischen RNA stammender RNA-oligomer-Rest gebunden. Eine Transkription oder Codierung von viralen Genprodukten findet am Plusstrang nicht statt.

Der Minusstrang (-) besitzt definierte 5'- und 3'-Enden. Die 4 Leserahmen (ORF, open reading frame) sind alle auf dem Minusstrang lokalisiert und überlappen sich teilweise (Seeger, Zoulim und Mason 2007). Durch die Überlappung der ORFs und der alternativen Nutzung der Startcodons ist das virale Genom relativ klein und kompakt (Landers, Greenberg und W.S. 1977). Am 5'-Ende des Minusstrangs ist die virale Polymerase mittels Phosphotyrosinbindungen kovalent gebunden (Gerlich und Robinson 1980).

Die Transkription wird von insgesamt 4 Promotoren, 6 Start-Codons, zwei Enhancern und einem Polyadenylierungs-Signal reguliert. Die 5 RNA-Transkripte sind die prägenomische RNA (pgRNA, 3,3kb), die präC/C-mRNA (3,5kb), die präS-mRNA (2,4kb), die S-mRNA (2,1kb) und die X-mRNA (0,7kb) (Enders, Ganem und Varmus 1985). Die RNA-Transkripte tragen am 5'-Ende eine Cap-Struktur und besitzen alle im Bereich des Core-Gens ein gemeinsames polyadenyliertes 3'-Ende (siehe **Abb. 3**).



Aus diesem Grund ist das HBeAg ein wichtiger Verlaufsparmater der viralen Replikation und wird in der Diagnostik routinemäßig bestimmt (Chen, et al. 2004). Das Core-Protein, oder Hepatitis-B-core-Antigen (HBcAg) bildet das Nukleokapsid (Nassal und Schaller 1993).

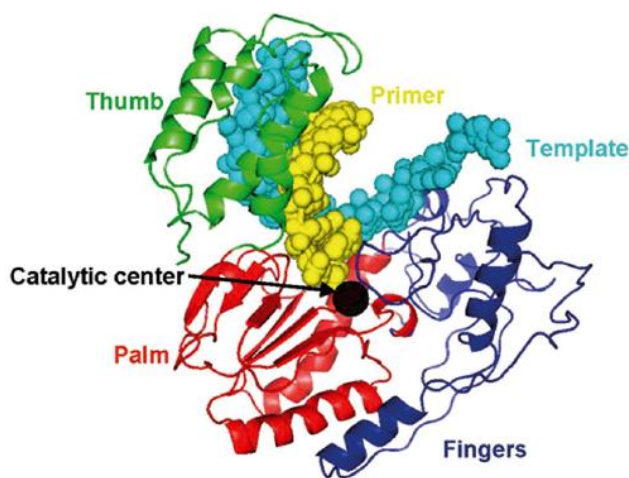
Die drei Oberflächenproteine L, M und S werden serologisch als Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg) zusammengefasst. Sie haben die C-terminale preS/S-Domäne gemeinsam und werden jeweils von einem Start-Codon auf dem offenen Leserahmen determiniert (L=preS1/preS2/S, M=preS2/S, und S=S). Das HBsAg aktiviert die humorale und zelluläre Immunantwort. Rekombinantes HBsAg findet deswegen Anwendung als HBV-Impfstoff.

Die Lokalisation der Aktivität des X-Proteins (HBx) liegt nach bisherigen Forschungsergebnissen im Bereich des Nukleus und der Mitochondrien (Henkler, et al. 2001). Ursprünglich wurde vermutet, dass das HBx als Aktivator der viralen Transkription fungiert und somit auch bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms eine wichtige Rolle einnimmt (Lara-Pezzi, et al. 2001). Nach aktuellem Stand der Erkenntnisse besitzt das HBx zusätzliche Funktionen. Neben der Stimulation der viralen Genexpression und Replikation, schützt das HBx auch vor der Zerstörung der infizierten Leberzelle durch das Immunsystem (Feitelson, Bonamassa und Arzumanyan 2014).

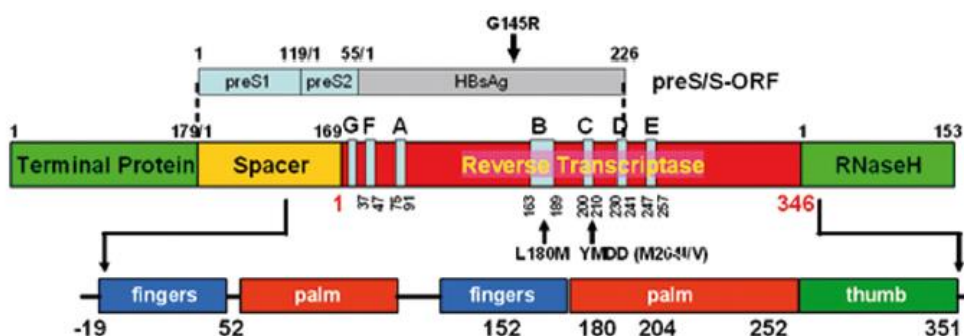
Die virale Polymerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNaseH-Aktivität. Je nach Genotyp ist die virale Polymerase aus 843 bis 845 Aminosäuren zusammengesetzt und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 90 kDa. Der Polymerase-Leserahmen stellt die längste kodierende Region des HBV-Genoms dar, sodass die Polymerase-Sequenzen mit den Leserahmen Core, preS/S und X überlappen. Das terminale Protein (Primer-Protein), die Reverse-Transkriptase-Region (ca. 75% der Polymerase-Sequenzen zeigen Homologien zu einer reversen Transkriptase-Aktivität) und die Ribonuklease H bilden die unterschiedlichen Domänen der Polymerase (siehe **Abb. 5.**). Die Aufgabe des terminalen Proteins (Aminosäure 1 bis 179) besteht im „Priming“ der DNA-Synthese. Für die „Spacer“-Region (Aminosäure 180 bis 348) konnte bisher keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden.



Die Reverse-Transkriptase(RT)-Region beinhaltet sieben hochkonservierte Subdomänen (A-G) und kodiert für die HBV-RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität (RT-Aktivität). Die Subdomänen katalysieren die Polymerasereaktion und sind in der Nukleotid- und prägenomische RNA-(Template) Bindung involviert (Locarnini, McMillan und Bartholomeusz 2003). Im Bereich des katalytischen Zentrums der RT (C-Domäne) befindet sich auch das YMDD-Motiv, welches bei der Resistenzentwicklung gegenüber Nukleosid-Analoga wie Lamivudin eine wichtige Rolle spielt (Kirishima, et al. 2002).



**Abb. 4: 3D-Modell der Reversen-Transkriptase-Region der HBV-Polymerase.** Einteilung in „fingers“, „palm“ und „thumb“-Domänen. Darstellung des katalytischen Zentrums (modifiziert nach Torresi 2006).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des HBV-Polymerase Leserahmens.** Terminales Protein, Spacer, Reverse Transkriptase mit den Subdomänen A-G und RNaseH. Die wichtigsten Resistenzmutationen L180M, M204V/I sind eingezeichnet. Über dem Polymerasegen ist der überlappende HBV preS/S-Leserahmen eingezeichnet. Unter dem Polymerasegen zeigen sich die Genomabschnitte des 3D-Modells mit finger, palm und thumb (Bock 2006).



### 1.1.7. Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus

Der HBV-Replikationszyklus ist komplex und bisher nicht vollständig bekannt. Die weitere Aufschlüsselung der einzelnen Replikationsschritte ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In **Abb. 6** wird die schematische Abfolge mit Nummerierung der bisher bekannten Replikationsschritte dargestellt.

Das Viruskapsid lagert sich zuerst mittels Interaktion der PräS1-Domäne des L-Oberflächenproteins an einem unbekanntem Rezeptor der Hepatozyten an. Die Virushülle fusioniert mit der Hepatozyten-Zellmembran, wobei das Viruskapsid endozytotisch in das Zytoplasma der Wirtszelle aufgenommen wird [1]. Innerhalb eines Tages erreicht das Kapsid die Zellkernmembran [2] (Kann und Gerlich 1994). Bei der Einschleusung des Kapsids durch die Poren der Zellkernmembran [3] ist das Protein Importin alpha/beta entscheidend beteiligt (Kann, Sodeik und al. 1999). Im Inneren des Zellkerns wird das virale Genom freigesetzt.

Das Genom liegt als relaxierte zirkuläre DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) vor und wird mittels zellulärer Reparaturenzymen in die kovalent geschlossene, ringförmige DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) umgeschrieben [4]. Im Zellkern organisiert sich das Genom dann als Nukleosom-assoziiertes Minichromosom (Bock, Schranz, et al. 1994) (Bock, Schwinn, et al. 2001). Die cccDNA dient als Matrize für die Transkription [6] der viralen mRNAs und der prägenomischen RNA durch die RNA-Polymerase II (Köck und Schlicht 1993). Durch Interaktion von Core-Protein und der viralen Polymerase wird die pgRNA auf dem Weg ins Zytoplasma in das Viruskapsid [7,8] eingefügt (Nassal und Schaller 1993). Dabei bindet der N-Terminus der Polymerase an den am 5'-Ende gelegenen Epsilonbereich der pgRNA, während der Carboxyterminus mit dem Core-Protein interagiert [9] (Kramvis und Kew 1998) (Hirsch, et al. 1990). Die enkapsidierte pgRNA ist terminal redundant und besitzt an beiden Seiten jeweils ein Epsilon Motiv und direct repeat 1 (DR1).

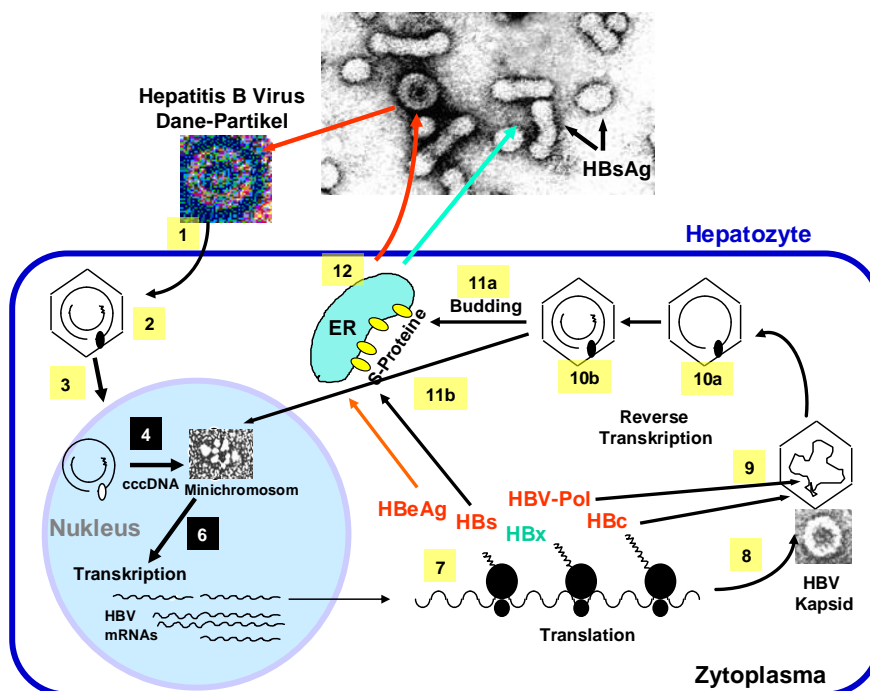
Im Kapsid wird die pgRNA revers transkribiert, wobei zunächst der vollständige Minusstrang und anschließend der unvollständige Plusstrang entsteht. Die HBV-Polymerase bindet an die Stamm-Schleifenstruktur des Epsilon Motivs am 5'-Ende der prägenomischen RNA. Der Tyrosinrest der HBV-Polymerase bietet

die Schnittstelle der Phospho-di-estergruppe mit dem ersten Nukleotid der Minusstrang-DNA und dient als Primer der Reversen Transkription (Zoulim und Seeger 1994).

Nach der Synthese des HBV-Minusstrangs [10a] baut die Polymerase mit Hilfe ihrer RNaseH-Aktivität die pgRNA bis auf ein kleines Restoligomer ab (Seeger und Mason 2000). Dieses Oligomer dient wiederum als Initialisierungsprimer für die HBV-Plusstrangsynthese. Nach Translokation an das direct repeat 2 (DR2) des HBV-Minusstrangs findet die HBV-Plusstrangsynthese [10b] entlang des Minusstrangs statt.

Die HBV-Plusstranglänge ist wahrscheinlich durch einen Abbruch der Synthese am 3'-Ende aufgrund des dNTP-Verbrauchs limitiert. Dadurch ist die letztendliche Länge des HBV-Plusstrangs variabel und beträgt ca. 40-85% der Länge des kompletten HBV-Genoms.

Nach abgeschlossener reversen Transkriptionsaktivität erfüllt das Hepatitis-B-Virus je nach Infektionsstadium unterschiedliche Funktionen. In der frühen Phase der Infektion werden die Virus-DNA-enthaltenden Nukleokapside in den Zellkern wiederaufgenommen und halten dort einen konstanten Vorrat an cccDNA aufrecht (Wu, et al. 1990). In späteren Stadien der Infektion wird das Virus sekretorisch aus der Zelle transportiert. Dabei fusioniert es mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums und bildet so seine Virushülle und die darin eingebundenen HBs-Antigene [11a] aus (Huovila und Eder 1992) (Ganem und Varmus 1987). Es folgt eine weitere Modifikation im Golgi-Vesikel und die anschließende Sezernierung des Viruskapsids aus dem Hepatozyten in den Blutkreislauf [12].



**Abb. 6: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus.** Beschreibung und Nummerierung siehe Text. (EM Abbildungen, Bock & Zentgraf 1992; in Anlehnung an Nassal & Schaller (Nassal und Schaller 1993).

## 1.2. Immunpathogenese der Hepatitis-B-Virusinfektion

Obwohl das HBV an sich nicht zytotoxisch ist, kommt es aufgrund der Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Zerstörung der Hepatozyten und damit zu konsekutiven Langzeitschäden wie Leberzirrhose und Leberzellkarzinom (HCC) (Chisari und Ferrari 1995).

Zunächst präsentieren Makrophagen HBV-spezifische Antigene über HLA-II Rezeptoren und führen aufgrund einer Aktivierung von CD4 T-Zellen zur Freisetzung von Zytokinen. Die T-Zell-Proliferation und Aktivierung der B-Zellen wird durch diese Vorgänge beschleunigt. Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8) erkennen die von der Leberzelle präsentierten Peptidfragmente des HBc-Antigens und führen über eine Aktivierung von Fas-Liganden zur Apoptose der Hepatozyten (Moradpour und Wands 1995). Zudem werden Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezerniert, welche selbst keinen zytotoxischen Effekt ausüben, jedoch die Replikation und Expression des Hepatitis-B-Virus

blockieren (Guidotti und Chisari 1996) (Guidotti und Ishikawa 1996). Bei der chronischen Verlaufsform der Hepatitis B kommt es zu einer teils massiven Freisetzung von HBe- und HBs-Antigenen. Diese induzieren eine Toleranz gegenüber dem Virus, indem sie die Bildung von HBcAg-spezifischen Antikörpern und die spezifische T-Zellreaktion gegen das HBcAg hemmen (Chen, et al. 2004). Aufgrund einer insuffizienten Immunantwort kommt es somit zu einer Persistenz des Virus und zur nekroinflammatorischen Schädigung der Leber.

Der Mechanismus der malignen Transformation zum hepatozellulären Karzinom ist nur teilweise bekannt. Das Risiko für eine maligne Entartung steigt bei Patienten mit chronischer Hepatitis B um den Faktor 100 (Beasley, et al. 1981). Die Höhe der Viruslast über 10 Jahre korreliert dabei mit dem Risiko der Leberzirrhose und Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (Iloeje, et al. 2006) (Chen, et al. 2006). Durch den Entzündungsprozess aktivierte Makrophagen bilden freie Radikale, welche zu oxidativen DNA-Schäden führen (Hagen, et al. 1994). Weitere pathogene Mechanismen sind der Einbau von viraler DNA in das zelluläre Genom und die damit verbundene Beeinflussung des zellulären Wachstums, die Hemmung des Tumorsuppressorgens p53 durch das virale X-Protein, sowie dessen Wirkung als Transaktivator für zelluläre und virale Promotoren (F. Chisari 2000).

## **1.3. Infektion und Verlaufsformen der Hepatitis B**

### **1.3.1. Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus**

Die Übertragung des HBV-Erregers kann über direkten Kontakt mit Blut oder Blutprodukten, wie bei Stichverletzungen, kontaminierten Injektionen/Transfusionen, perinatalen Infektionen, ungeschütztem sexuellem Kontakt oder Organtransplantationen erfolgen. Bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten kann das Virus über Mikroläsionen der Schleimhäute in den fremden Organismus eindringen und zu einer Infektion führen.

In Gegenden mit niedriger Prävalenz findet die Übertragung hauptsächlich über ungeschützten sexuellen Kontakt und intravenösen Drogenmissbrauch statt

(Wasley, Grytdal und Gallagher 2008). In Hoch-Prävalenz Gebieten überwiegt die perinatale Infektion (Akhter, et al. 1992). Da das Risiko eine chronische Hepatitis B (CHB) zu entwickeln direkt mit dem Alter zum Zeitpunkt der Infektion korreliert, beträgt das Risiko bei perinatal akquirierter Infektion annähernd 90%. Bei Infektionen im Erwachsenenalter nur noch weniger als 5% (Stevens, et al. 1975) (Wasley, Grytdal und Gallagher 2008). Eine früh erworbene Hepatitis B geht dabei mit einem wesentlich höheren Schweregrad und einer deutlich gesteigerten Komplikationsrate einher (Hyams 1995).

### **1.3.2. Akute und chronische Hepatitis B**

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verläuft variabel (siehe Abb. 7). Bei 65% der HBV-Infizierten zeigt sich ein inapparenter Verlauf mit subklinischen Symptomen. In 30% der Fälle schließt sich nach einer Inkubationszeit von 6 Wochen bis zu 6 Monaten ein Prodromalstadium an, welches geprägt ist von unspezifischen Symptomen wie Emesis, Nausea, Inappetenz, Fieber, Oberbauchschmerzen und Arthralgien. Gewöhnlich sistieren diese Symptome beim Einsetzen der Hepatitis.

Klinische Zeichen einer Hepatitis sind Leberdruckschmerz, Hepatomegalie, Ikterus an Konjunktiven und Haut, sowie acholischer Stuhl. Laborchemisch finden sich initial deutlich erhöhte Transaminasenwerte. Eine Persistenz dieser Parameter über mehr als vier Monate kann Hinweis auf eine beginnende Chronifizierung sein. Zu 90-95% heilt die akute Infektion jedoch folgenlos aus.

Bei ca. 5% der HBV-infizierten Patienten entwickelt sich eine chronische Verlaufsform, die sich häufig primär asymptomatisch zeigt. Die CHB ist deshalb definiert als eine länger als 6 Monate andauernde Persistenz der viralen Marker HBsAg oder Virus-DNA im Serum. Der Nachweis erfolgt zweimal zu unabhängigen Zeitpunkten (de Franchis, et al. 2003). Erst spät entwickeln sich Symptome und Stigmata wie Splenomegalie, Spider-Nävi, Palmarerythem, Caput medusae, Hodenatrophie oder Gynäkomastie. Im Zustand der dekompensierten Leberzirrhose kann es schließlich zu Ikterus, Aszites, periphere Ödeme und einer hepatischen Enzephalopathie kommen.

In der Literatur werden zwei charakteristische Phasen der CHB unterschieden. Die Progression durch diese Phasen erfolgt hierbei nicht immer linear. Die Immuntoleranzphase, die insbesondere bei der perinatal erworbenen Infektion lange anhält, erstreckt sich über 10-30 Jahre und weist einen hohen Grad an HBV-Replikationsaktivität auf. Im Serum lassen sich deutlich erhöhte HBV-DNA-Titer und HBeAg-Konzentrationen nachweisen (siehe **Abb. 8**). Trotzdem hält sich der Organschaden der Leber in Grenzen, die Transaminasen sind nicht erhöht und histologisch zeigen sich in der Leberbiopsie nur minimale Veränderungen (Dienstag 2008).

Während der Immuneliminationsphase finden, insbesondere durch Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten und damit einhergehender Zerstörung der Hepatozyten, inflammatorische Prozesse statt. Laborchemisch zeigen sich schwankende Transaminasen-Werte („Flares“) und eine fluktuierende Virämie. Bei vielen Patienten lässt sich HBe-Antigen nachweisen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-10% ist eine HBe-Serokonversion oder ein spontaner HBeAg-Verlust zu beobachten (Fattovich, Brollo, et al. 1991). Diese Patienten werden zu asymptomatischen Trägern.

Patienten, bei denen sich keine HBV-DNA nachweisen lässt, die aber HBsAg positiv bleiben, befinden sich in einem inaktiven Trägerstatus (M. Cornberg, et al. 2007). Es bedarf einer gründlichen medizinischen Überwachung dieser Patienten, da insbesondere unter Immunsuppression bei einem großen Teil eine Reaktivierung der CHB im Verlauf möglich ist. Bei einem geringen Anteil der inaktiven Träger (ca. 1%) kommt es im Verlauf zu einer spontanen HBsAg-Serokonversion (Tang, Hsu und Lin 1998).

Faktoren, die die Progression der CHB begünstigen sind männliches Geschlecht, Alkoholkonsum, Immunsuppression und gleichzeitige Virusinfektionen mit Hepatitis C- und D-Virus (HCV und HDV) oder dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Pallas, Farinas-Alvarez und Prieto 1999). Bei den CHB-Patienten besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Leberzirrhose und/oder ein Leberzellkarzinom (El-Serag 2002). Die 5-Jahres-Wahrscheinlichkeit eine Leberzirrhose zu entwickeln liegt bei ca. 20%. Davon

erkranken wiederum ca. 15% innerhalb von 5 Jahren an einem hepatozellulären Karzinom (Fattovich, Bortolotti und Donato 2008).

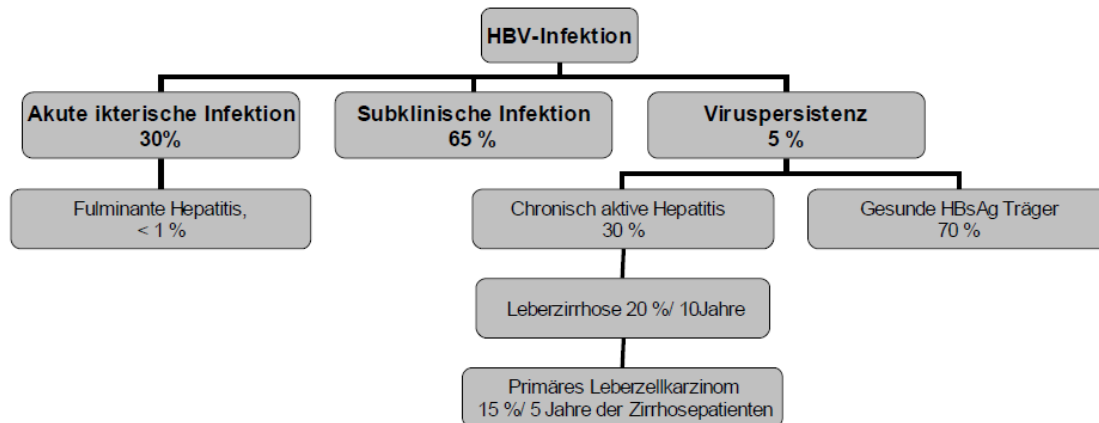


Abb. 7: **Verlaufsformen der HBV-Infektion** bei erwachsenen Patienten mit prozentualen Wahrscheinlichkeiten (modifiziert nach Herold, 2007).

## 1.4. Diagnostik der Hepatitis B

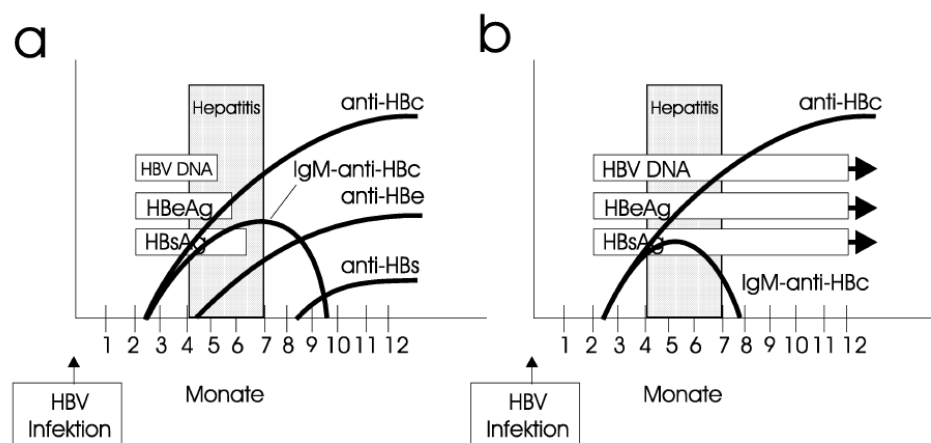
Eine HBV-Diagnostik sollte grundsätzlich bei Personen durchgeführt werden, die Zeichen einer Leberschädigung zeigen. Dazu gehören klinische Zeichen einer Hepatitis, erhöhte Transaminasen, Leberzirrhose/-fibrose oder ein hepatozelluläres Karzinom. Des Weiteren kann eine HBV-Diagnostik bei Mitgliedern von Risikogruppen wie medizinisches Personal, homosexuelle Männer, Promiskuität, bei aktiven oder ehemaligen i.v. Drogenabhängigen, bei Dialyse-Patienten, HIV- und/oder HCV-Infizierten, Empfängern von Organtransplantaten, Schwangeren und Kinder von HBsAg-positiven Müttern sinnvoll sein (M. Cornberg, et al. 2011).

### 1.4.1. Serologische Diagnostik

Im Rahmen der Basisdiagnostik kommen zu allererst serologische Nachweismethoden, wie die Enzym-gekoppelte Antikörper-Analyse (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA) zum Einsatz. Hinweis auf eine akute oder chronische Hepatitis-B-Virusinfektion sind positive anti-HBcAg Antikörper. Zur

weiteren diagnostischen Einordnung einer HBV-Infektion werden HBeAg, anti-HBeAg, HBsAg, HBcAg und die HBV-DNA-Viruslast bestimmt (siehe **Abb. 8**). HBeAg ist in der Regel nur zum Zeitpunkt einer akuten oder aktiven Hepatitis B mit hoher Replikationsaktivität nachzuweisen. Ausnahme bilden die sogenannten Pre-Core-Mutationen, die trotz negativem HBeAg eine hohe Replikationsaktivität und Progressionsrisiko zum Hepatozellulären Karzinom aufweisen (Schildgren 2009).

Dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung der HBV-DNA kommt ein besonderer Stellenwert hinsichtlich Therapiebeginn, Therapiemonitoring und Mutationsbestimmungen zu. Eine Quantifizierung der Virus-DNA wird daher von vielen Leitlinien-Autoren empfohlen (M. Cornberg, et al. 2007) (de Franchis, et al. 2003). Bei Patienten mit HBeAg-negativer chronischer Hepatitis ist die HBV-DNA-Viruslast zudem der einzige verwendbare Verlaufsparemeter (Manesis, Papatheodoridis, et al. 2003).



**Abb. 8: Nachweismöglichkeit serologischer Parameter** (HBeAg, HBsAg, anti-HBc, anti-HBe und anti-HBs), sowie der HBV-DNA im zeitlichen Verlauf bei einer akuten (a) und chronischen (b) HBV-Infektion (Classen, Diehl und Kochsiek 1994).

#### 1.4.2. Phänotypische und genotypische Diagnostik

Die Kombination der Erkenntnisse aus phänotypischer und genotypischer Analyse macht den optimalen Einsatz von unterschiedlichen Nukleos(t)id-Analoga möglich. Die phänotypische Analyse zeigt das zu erwartende Ansprechen eines HBV-Stammes unter verschiedenen Therapieregimen *in*



*vivo*: Unter dem Einsatz von z.B. rekombinanten Baculoviren werden in Zellkulturexperimenten transiente und stabile Transfektionen durchgeführt. Anhand der Medikamentenkonzentration, die nötig ist um die Virusreplikation um die Hälfte zu reduzieren kann die inhibitorische Konzentration (IC50) ermittelt werden. Ein Anstieg um mehr als das 10fache der IC50 im Vergleich zum Wildtyp spricht für eine Resistenz (Chin, et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit der phänotypischen Analyse ist die virtuelle Phänotypisierung mittels der weltweit zugänglichen Datenbank SeqHepB (<http://www.seqhepb.com/>). Mit dieser Datenbank kann z.B. die 3D-Struktur der reversen Transkriptase mit Mustern aus Resistenzmutanten verglichen werden (Yuen, et al. 2007).

Im Rahmen genotypischer Analysen können Mutationen in spezifischen Gen-Regionen identifiziert werden, indem Sequenzen mit der Wildtyp-Sequenz oder bereits beschriebenen Resistenzmutationen abgeglichen werden (Lok und Zoulim F. 2007). Immer mehr Studien untermauern zudem die Bedeutung des HBV-Genotyps für die Beurteilung des Infektionsverlaufs, der Progressionsrate der Erkrankung und des Therapieansprechens. Patienten mit dem Genotyp A haben zum Beispiel ein vergleichsweise besseres Ansprechen auf die antivirale Therapie mit Interferonen, als Patienten mit anderen Genotypen (Kao, Wu, et al. 2000) (Guettouche und Hnatsyszyn 2005). Auch Kreuz-Resistenzen zwischen Nukleos(t)id-Analoga spielen im Hinblick auf den Genotyp eine entscheidende Rolle (Schildgen, et al. 2006).

Die Identifizierung des HBV-Genotyps kann über direkte Sequenzierung, Hybridisierung oder die Darstellung eines Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) erfolgen (Hussain, et al. 2003).

## **1.5. Therapie der Hepatitis B**

### **1.5.1. Überblick**

Die fortwährende Entwicklung neuer Wirksubstanzen und Erforschung wirkstoffspezifischer Resistenzmutationen führen zu einer ständigen Reevaluation der Behandlungsparadigmen. Zur Therapieplanung werden

Faktoren wie Alter des Patienten, Ausprägung der Lebererkrankung, Ansprechwahrscheinlichkeit und Nebenwirkungsprofil herangezogen. Die Indikation zur antiviralen Therapie ist dann gegeben, wenn die durch die Lebererkrankung bedingte Morbidität und Mortalität gesenkt, oder eine dauerhafte Virussuppression erzielt werden kann (Lok und McMahon 2007). Hauptsächlich sollten somit Patienten in der immunaktiven Phase behandelt werden, da hier das Progressionsrisiko der Hepatitis zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom am höchsten ist (Yuen, et al. 2005).

### **1.5.2. Impfprophylaxe**

Die breitflächige Impfung gegen HBV wird vor allem in Endemiegebieten und bei Mitgliedern von Risikogruppen empfohlen (Robert Koch Institut 2011). In einer taiwanesischen Studie über hepatozelluläre Karzinome bei Kindern konnte ein deutlicher Rückgang der Karzinom-Inzidenz nach Einführung des HBV- Impfprogramms festgestellt werden (Chang, et al. 1997). Da der Mensch der einzig relevante Wirt ist, wäre ähnlich wie bei der Pockenimpfung langfristig eine Eradikation des Virus sogar möglich.

Der Impferfolg wird durch serologische Bestimmung der anti-HBs Antikörper kontrolliert. Ein negativer HBcAg-Antikörper Test und positive HBsAg-Antikörper zeigen eine erfolgreiche Impfung des Patienten an. Diese sind in 90-95% der Fälle nach ca. einem Monat nachweisbar (Coates, et al. 2001). Die Kontrolle des Impfstatus wird vor allem für Mitarbeiter im Gesundheitswesen empfohlen, da sie zur Hochrisikogruppe zählen. Bei Kontakt mit HBV-kontaminiertem Material, z.B. bei einer Nadelstichverletzung wird eine aktive und passive Immunisierung mit kombinierter Gabe von aktivem Impfstoff und spezifischen Immunglobulinen innerhalb von 48h empfohlen (M. Cornberg, et al. 2011).

### **1.5.3. Therapie der akuten Hepatitis B**

Die akute Hepatitis B heilt in 95-99% der Fälle spontan aus (McMahon, et al. 1985). Eine grundsätzliche Verbesserung der Ausheilung durch eine antivirale Therapie ist bisher nicht nachgewiesen worden. Einzelne Fallberichte aus

Europa zeigen, dass zur Vermeidung einer Not-Lebertransplantation bei schwerer oder fulminant verlaufender akuter Hepatitis B eine frühe antivirale Therapie sinnvoll sein kann (Tillmann, Hadem, et al. 2006). Der Anteil der akuten Infektionen, die in eine fulminante Hepatitis mit letalem Ausgang übergeht liegt jedoch bei unter 1% (Kondili, Osman und Mutimer 2004). Im Rahmen einer chinesischen und einer indischen Studie wurde eine Lamivudin-Therapie versus Placebo verglichen. In der chinesischen Studie zeigte sich ein positiver Effekt bezüglich „Outcome“ und Mortalität (Yu, et al. 2009), die indische Studie zeigte hingegen keinen Vorteil der Lamivudin-Therapie (Kumar, et al. 2007). Nach aktuellem Kenntnisstand besteht bei der akuten Hepatitis B lediglich bei der Progression zum fulminanten Leberversagens eine Indikation zur medikamentösen antiviralen Therapie.

#### **1.5.4. Therapie der chronischen Hepatitis B**

Alle Patienten mit einer CHB kommen prinzipiell für eine antivirale Therapie in Frage. Entscheidend sind die Viruslast (Grenze  $10^4$  Viruskopien/ml bzw.  $2 \times 10^3$  IU/ml), der Transaminasen-Anstieg im Serum und Erkenntnisse aus der Leberbiopsie bezüglich Entzündungsaktivität und Fibrosegrad (M. Cornberg, et al. 2011). Es werden 2 Substanzklassen der medikamentösen Therapie unterschieden. Neben den (pegylierten) Interferonen kommen reverse Transkriptasehemmer (NRTI; Nukleos(t)id-Analoga) zum Einsatz.

Aktuell sind sechs medikamentöse Wirkstoffe zugelassen: Interferone (IFN), Lamivudin (LAM), Adefovir (ADV), Entecavir (ETV), Telbivudin (TBV) und Tenofovir (TDF). Weitere Nukleos(t)id-Analoga wie Emtricitabine, Clevudine, Torcitabine, Amdoxovir und Alamifovir befinden sich in der klinischen Entwicklung.

Eine IFN-Therapie ist aufgrund Nebenwirkungen zeitlich begrenzt und sollte deshalb, wenn möglich als primäre Therapieoption gewählt werden (Craxi, Di Bona und Camma 2003). Bei HBeAg-positiven Patienten, die eine geringe Viruslast und hohe Aminotransferasen-Aktivität besitzen, kommt es häufig zu einer HBeAg-Serokonversion. Dieses Patientenkollektiv profitiert von einer initialen Kurzzeittherapie mit pegyliertem IFN- $\alpha$  in besonderem Ausmaß.

Alternativ kommt eine zwei- oder dreijährige Nukleos(t)id-Analoga-Therapie mit deutlich besserem Nebenwirkungsprofil in Frage (Marcellin, Chang und Lim 2005).

Der primäre Einsatz von Nukleos(t)id-Analoga mit hoher Resistenzbarriere wie ETV oder TDF sollte bei Vorliegen einer Leberzirrhose oder einer hohen Viruslast  $>10^6$  IU/ml erwogen werden. Primäre Kombinationstherapien werden in der aktuellen Leitlinie zur Behandlung der CHB nicht mehr empfohlen. Ein additiver oder synergistischer Effekt ließ sich weder für die Substanzkombination LAM mit TBV noch für LAM mit ADV zeigen (Lai, Leung, et al. 2005) (Sung, et al. 2008). Auch die Add on –Strategie mit zusätzlicher Gabe von ADV nach Auftreten einer LAM-Resistenz wurde zugunsten einer Umstellung auf ETV oder TDF verlassen (M. Cornberg, et al. 2011).

#### 1.5.4.1. **Interferone**

Interferone (IFN) sind natürlich vorkommende Zytokine mit immunmodulatorischer, antiproliferativer und antiviraler Wirkung. Die IFN-Monotherapie ist seit Ende der 90er Jahre etabliert und wird bei HBeAg positiven und negativen Patienten eingesetzt (Guan 2000). Die Therapiedauer beträgt 16-24 Wochen bei HBeAg-positiver CHB. Bei HBeAg-negativer CHB muss aufgrund eines schlechteren Therapieansprechens 48 Wochen therapiert werden (Manesis und Hadziyannis 2001). Aus Metaanalysen von IFN-Studien geht hervor, dass bei 37% der therapierten Patienten eine Suppression der HBV-DNA auf unter  $10^5$  Kopien/ml möglich war (Wong, et al. 1993). In Langzeitstudien zeigte sich bei IFN-Respondern zu 88% eine anhaltende Virussuppression (Krogsgaard 1998).

Eine Weiterentwicklung sind die pegylierten IFN- $\alpha$ -2a-Präparate. Aufgrund eines verzweigten Polyethylenglykol (PEG)-Anteils verlängert sich die Halbwertszeit. Als subkutanes Depotpräparat ist eine einmalige Applikation pro Woche ausreichend (H. L. Tillmann 2007). Bei einem Drittel der mit PEG-IFN behandelten Patienten ist eine HBe-Antigen Serokonversion zu beobachten (Lau, et al. 2005). Ca. 5% entwickeln eine HBs-Antigen Serokonversion und bei 20% der behandelten Patienten zeigt sich eine niedrige Replikationsrate nach

Beendigung der PEG-IFN-Therapie (Bonino, et al. 2007). Der Erfolg der IFN-Therapie korreliert mit dem Genotyp. Patienten mit einer CHB vom Genotyp A haben im Vergleich zum Genotyp D ein besseres Therapieansprechen (A. Erhardt, et al. 2005). Analog dazu verhält sich Genotyp B günstiger im Vergleich zu Genotyp C (Wai, et al. 2002).

Das ausgeprägte Nebenwirkungsprofil der IFN-Therapie mit grippeähnlichen Symptomen, Anorexie, Haarverlust, psychiatrische Komplikationen (Depression, Suizidalität) und Knochenmarkschädigung, bedingt häufig einen frühzeitigen Therapieabbruch (Lok und McMahon 2004).

#### 1.5.4.2. **Nukleos(t)id-Analoga**

Nukleos(t)id-Analoga sind reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und zeichnen sich im Vergleich zu den Interferonen durch ein geringeres Nebenwirkungsspektrum aus. Sie sind annähernd identisch aufgebaut wie die natürlichen Nukleos(t)id-Bausteine der DNA. Lediglich einzelne Moleküle (meist der Zuckeranteil) sind verändert. Durch Einbau der Nukleos(t)id-Analoga in den DNA-Strang wird die Replikation durch Kettenabbruch verhindert. Eine suffiziente Kontrolle der Virusreplikation macht jedoch eine Langzeittherapie erforderlich, da die Virusproduktion sehr effizient ist und die virale cccDNA im Kern der infizierten Zellen eine lange Halbwertszeit von ca. 6-10 Tagen aufweist (Singh, et al. 2004). Im Rahmen des intrazellulären Infektionswegs findet zudem eine permanente Erneuerung der cccDNA statt.

Lamivudin (LAM, Zeffix®, Epivir®) war der erste zugelassene reverse Transkriptase-Inhibitor. LAM zeichnet sich durch gute Verträglichkeit in der klinischen Anwendung aus, bei schwacher antiviraler Wirkung und einer raschen Resistenzentwicklung.

Adefovir (ADV, Hepsera®) war der zweite zugelassene reverse Transkriptase-Inhibitor nach LAM. Aufgrund einer ausgeprägten Nephrotoxizität mit Gefahr der Laktatazidose, wird ADV in den aktuellen Leitlinien nicht mehr zur Primärtherapie empfohlen (M. Cornberg, et al. 2011). ADV war lange Zeit das Mittel der Wahl bei LAM-Resistenzen, HIV-Koinfektion oder zur antiviralen Therapie vor und nach Lebertransplantationen. Es zeigte sich ein guter 1-

Jahres-Therapieeffekt sowohl bei HBeAg-positiven, als auch bei HBeAg-negativen Patienten (Hadziyannis und Papatheodoridis 2003) (P. Marcellin, T. Chang, et al. 2003). Die Resistenzmutationen im Zuge der ADV-Therapie entwickelten sich deutlich langsamer im direkten Vergleich zu LAM. Patienten die mit LAM vorbehandelt wurden, zeigten jedoch ein erhöhtes Risiko eine ADV-Resistenz zu entwickeln (Lee, et al. 2006).

Zur Gruppe der neuen Nukleosid-Analoga gehört Telbivudin (TBV, Sebivo®). Ungefähr 9-22% der therapienaiven Patienten entwickeln eine Resistenz gegen TBV. Die Resistenzmutation befinden sich wie bei LAM im YMDD-Motiv (M204I) (Lai, et al. 2006). Eine Kombinationstherapie mit LAM und TBV bringt deswegen keinen zusätzlichen antiviralen Effekt und verhindert nicht die Resistenzentwicklung (Lai, Leung, et al. 2005).

Entecavir (ETV, Baraclude®) hat eine gute antivirale Wirksamkeit bei später Resistenzentwicklung (Chang, Gish und De Man 2006). Bei therapienaiven Patienten ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung 0,8%. Bei LAM-resistenten Patienten steigt das Resistenzrisiko für ETV nach vierjähriger Medikation hingegen auf ca. 40% (Colonna, et al. 2007). Eine komplette Resistenz entsteht erst nach mehreren Teilmutationen. Im ersten Schritt führen Mutationen an Position 204 (M204V und M204I) zu einer LAM-Resistenz. Eine Mutation an Position 180 (rtL 180M) verbessert die Vermehrungskapazität der LAM-resistenten Varianten. Zuletzt treten dann die ETV-spezifische Mutationen (T184S/A/I/L, S202G/C bzw. M250I/V) auf (Tenney, et al. 2004). Vorläufige Daten zeigen auch einen Zusammenhang zwischen ADV-Resistenzen und Wirkungsverlust der ETV-Therapie (Reijnders, et al. 2007).

Tenofovir (TDF, Viread®) zeichnet sich durch eine gute antivirale Wirksamkeit bei langsamer Resistenzentwicklung aus (Nelson, Portsmouth und Stebbing 2003). Aufgrund der hohen Resistenzbarriere wird TDF bei Patienten mit Leberzirrhose oder hoher HBV-DNA-Konzentration als Primärtherapie empfohlen (M. Cornberg, et al. 2011). Es wurde bisher eine Mutation an Kodon 194 (A194T) beschrieben, die allerdings nicht sicher mit einer klinischen Resistenz assoziiert ist. Es besteht eine Wirksamkeit bei LAM-resistenten Patienten, bei Akkumulation mehrerer LAM-Mutationen kann die antivirale

Wirksamkeit von TDF jedoch reduziert werden (Lada, et al. 2008). Eine Kreuzreaktion mit ADV-Resistenzen ist nach aktueller Studienlage nicht vorhanden (Berg, et al. 2008) (Van Bommel, et al. 2006).

### **1.5.5. Therapie-Monitoring und Behandlungsendpunkte**

Ziel der Therapie der CHB ist es, die Morbidität und Mortalität zu senken. Dafür müssen virologische, biochemische und histologische Surrogatmarker während und nach der Behandlung herangezogen werden. Es wird eine dauerhafte Suppression der HBV-DNA-Viruslast unter die Nachweisgrenze, die Normalisierung der Transaminasenwerte, die Abnahme der entzündlichen Aktivität in der Leber und Serokonversion von HBs-Antigen zu Anti-HBs-Antikörpern angestrebt (M. Cornberg, et al. 2011).

Bei Verdacht auf ein primäres oder sekundäres Therapieversagen wird nach Überprüfung der „Adhärenz“ des Patienten eine molekularbiologische Diagnostik auf Resistenzmutationen in Erwägung gezogen.

Bei HBeAg-positiven Patienten nimmt die HBe-Antigen-Serokonversion eine zentrale Rolle in der Therapiebeurteilung ein. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dauerhafter Serokonversion und Reduktion der Morbidität und Mortalität (Niederau, et al. 1996). Bei der Interferon-basierten Therapie stellt ein Nicht-Erreichen der HBe-Antigen-Serokonversion im Behandlungszeitraum ein Therapieversagen dar.

Bei den Nukleos(t)id-Analoga spricht man von einem primären Therapieversagen dann, wenn die Konzentration der viralen DNA in einem Zeitraum von 6 Monaten nicht auf  $< 200$  IU/ml reduziert wird oder nach 12 Monaten noch nachweisbar ist. Als sekundäres Therapieversagen wird der Wiederanstieg der HBV-DNA-Konzentration um mindestens 1 log-Stufe nach anfänglich gutem Ansprechen auf die Therapie bezeichnet (M. Cornberg, et al. 2011). Die Selektion von Resistenzmutation gehört hier zu den wichtigsten Ursachen (Locarnini, Hatzakis, et al. 2004). Falls keine Leberzirrhose vorliegt, kann die Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga 12 Monate nach HBeAg-Serokonversion beendet werden. Vor Beendigung der Therapie sollte die HBV-DNA unter die Nachweisgrenze supprimiert sein. Bei Patienten mit einer

HBeAg-negativen CHB ist die Therapiedauer nicht fest definiert, in der Regel ist eine Dauertherapie nötig (M. Cornberg, et al. 2011).

Eine vollständige Eradikation des HBV kann aufgrund der fehlenden Wirkung der Therapie auf die kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) in der Leberzelle nicht erreicht werden. In mehreren Studien konnte jedoch ein positiver Behandlungseffekt auf den allgemeinen Gesundheitszustand und die Leberfunktion festgestellt werden. Dies ließ sich für verschiedene medikamentöse Behandlungsoptionen wie PEG-IFN (Lau, Bonino und al. 2004), LAM (Liaw, et al. 1996), ADV (S. Hadziyannis, et al. 2005), ETV (Lai, Shouval, et al. 2006) und TDF (Heathcote, Marcellin und Buti 2011) anhand histologischer Untersuchungen und Einschätzung des Leberfibrosegrades objektivieren.

## **1.6. Resistenzmutationen unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie mit Lamivudin und Adefovir**

### **1.6.1. Überblick**

Verantwortlich für die ausgeprägte genetische Variabilität des HBV sind die Faktoren „hohe Replikationsrate“ und „Fehlen einer Lesekorrekture-Aktivität“ („proof reading“) der HBV-Polymerase. Dadurch entsteht eine Vielzahl von HBV-Quasispezies. Quasispezies sind HBV-Stämme mit Spontanmutationen, wobei die Virusmutante mit dem größten Selektionsvorteil dominiert. Ein Selektionsvorteil kann z.B. eine gesteigerte Replikationskompetenz im Vergleich zum Wildtyp sein. Auch der Selektionsdruck durch Immunantwort oder aufgrund einer antiviralen Therapie führt zur Ausbildung entsprechender Virusmutanten. Mutationen, wie sie im Rahmen der CHB auftreten, zeigen eine Häufung in den Regionen preC/C und preS/S des viralen Genoms (siehe **Abb. 10**) (Bock 2006). Die Resistenzmutationen gegenüber der LAM- und ADV-Therapie befinden sich in den hochkonservierten Domänen in der Reversen-Transkriptase(RT)-Region der viralen Polymerase (siehe **Abb. 11**).

Lamivudin (LAM) zeichnet sich durch eine rasche Resistenzentwicklung während der Therapie aus: 14-32% der Patienten zeigen eine



Resistenzmutation innerhalb des ersten Jahres der Behandlung, 38% nach zweijähriger Behandlung und 53-76% nach dreijähriger Behandlung (Lai, Dienstag, et al. 2003).

Die Resistenzmutationen gegenüber Adefovir (ADV) treten im Vergleich zu den LAM-Resistenzmutationen später im Therapieverlauf auf (siehe **Abb. 9**). Nach fünfjähriger ADV-Monotherapie lassen sich in 29% der behandelten Patienten die Resistenzmutationen rtN236T oder rtA181V in der Reversen-Transkriptase-Region der HBV-Polymerase (siehe **Abb. 11**) nachweisen (Borrito-Esoda, et al. 2006).

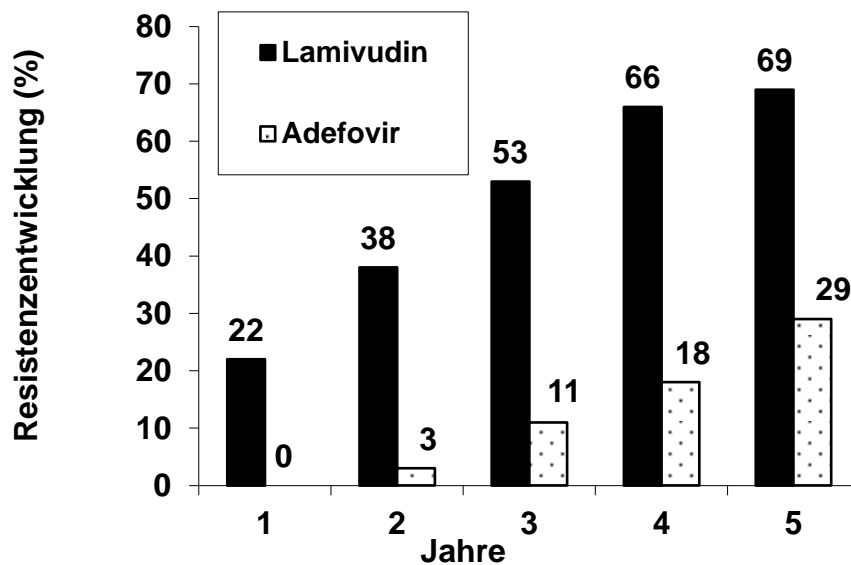


Abb. 9: Resistenzentwicklung in Prozent bei Lamivudin und Adefovir-Therapie im Zeitraum von 5 Jahren. (H. L. Tillmann 2007)

### 1.6.2. Lokalisation der Lamivudin- und Adefovir-Resistenzmutationen in der Reversen-Transkriptase-Region der Hepatitis-B-Virus-Polymerase

Der Polymerase-Leserahmen stellt die längste kodierende Region im HBV-Genom dar. Die bekannten LAM-Resistenzmutation rtM204V/I befinden sich in der Reversen-Transkriptase-Region der HBV-Polymerase im YMDD-Motiv (C-Domäne; siehe **Abb. 10**). Mit „YMDD“ wird die Aminosäuresequenz „Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat“ bezeichnet. Bei der Selektion von

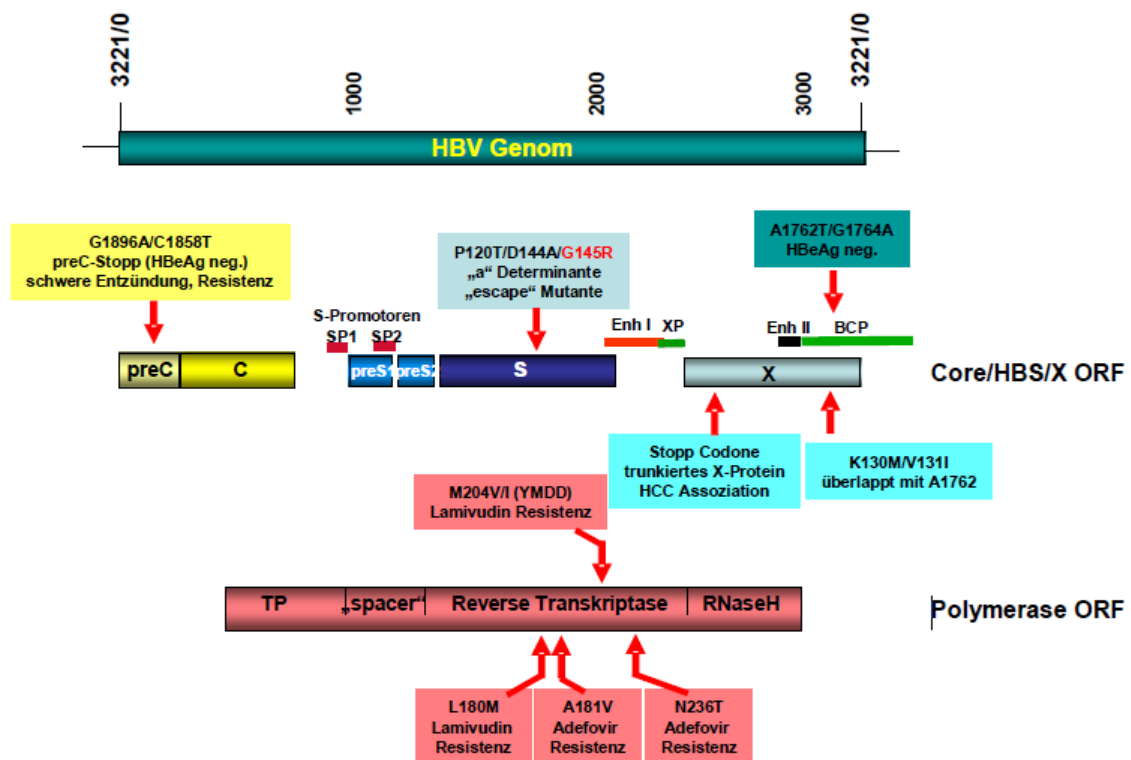
Resistenzmutationen findet ein Austausch von Methionin mit wahlweise Valin oder Isoleucin im Bereich des Kodons 204 statt. Die wichtigsten Resistenzmutationen werden nomenklatorisch mit rtM204V (YVDD-Sequenz), rtM204I (YIDD-Sequenz) und der seltenen Mutation rtM204S (YSDD-Sequenz) angegeben (Allen, et al. 1998). An der Position rtL180M (Leuzin nach Methionin) im Bereich der B-Domäne der Reversen-Transkriptase-Region findet sich eine weitere mit der LAM-selektierten YMDD-Variante rtM204V assoziierte Mutation (siehe **Abb. 11**).

Im Rahmen von Sequenzanalysen bei klinischen schweren Verläufen nach Lebertransplantation konnte eine weitere Mutation im Kodon T128N (Threonin nach Asparagin) des Polymerasegens entsprechend dem Kodon 120 des HBV-Oberflächenproteins (sP120T; Prolin nach Threonin) nachgewiesen werden. Funktionelle Analysen der Mutationskombination sP120T/rtL180M/rtM204V zeigten eine Steigerung der Replikationskompetenz dieser Resistenzvariante in Anwesenheit von LAM (Bock, Tillmann, et al. 2002).

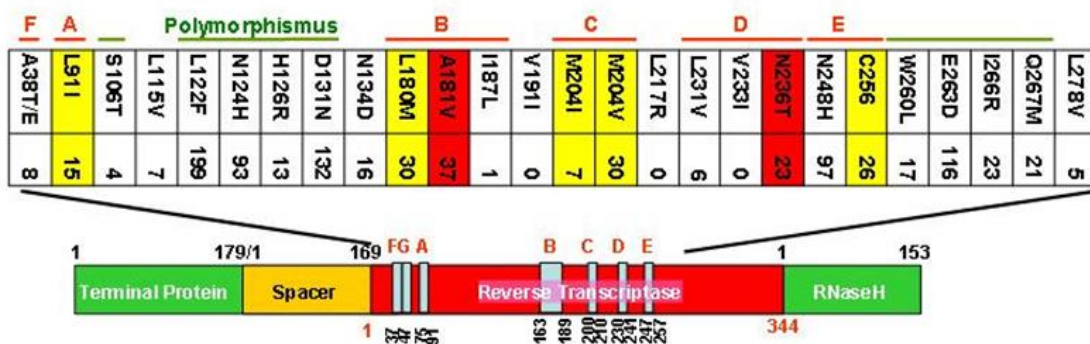
Zusätzlich können zahlreiche Kreuzresistenzen gegenüber anderen Nukleos(t)id-Analoga durch eine LAM-Therapie induziert werden. So werden durch eine LAM-Resistenz auch moderne Nukleos(t)id-Analoga wie z.B. TBV, ETV oder TDF in ihrer antiviralen Wirksamkeit reduziert (Lai, et al. 2006) (Lada, et al. 2008).

Die ADV-Resistenzmutationen rtN236T oder rtA181V befinden sich in der Reversen-Transkriptase-Region der HBV-Polymerase (siehe **Abb. 11**).

Eine Sonderstellung nimmt die ADV-Resistenzmutation rtA181T ein, die nur in Kombination mit der Mutation rtN236T zu einer Resistenzentwicklung führt. Die Mutation rtA181T bewirkt dabei ein Stopp-Kodon im S-Leserahmen und erhöht direkt die Pathogenität des Hepatitis-B-Virus (Angus, et al. 2003).



**Abb. 10: Häufig selektionierte HBV-Mutationen.** preC/C-Mutationen mit preC-Stopp-Mutation (gelb), HBsAg „a“-Determinante Mutation („Immunescape Mutante“; blau), Polymerase Mutationen (Resistenz Mutationen; rot), X-Protein Mutationen (grün). (Bock 2006)



**Abb. 11: Detailsansicht der Reversen-Transkriptase-Region (Bock, 2007).** Gelb unterlegt sind die Lamivudin-Resistenzen, rot unterlegt sind die Adefovir-Resistenzen. Die hellroten Buchstaben A-F bezeichnen die hochkonservierten Domänen in der RT-Region der viralen Polymerase. Die Nummerierung entspricht dem Konsens des HEP DART International Comitee (Stuyver, et al. 2001).

## **1.7. Neue diagnostische Ansätze zur Beurteilung der Hepatitis-B-Virusaktivität und des Resistenzverhaltens**

### **1.7.1. HBV-cccDNA als Indikator der Virus-Reaktivierung**

Die HBV-cccDNA kann mittels selektiver real-time PCR detektiert und quantifiziert werden. Dazu werden Primer genutzt, die über die Lücke des Minusstrangs reichen und mit der variablen Region des Plusstranges korrespondieren. Eine Differenzierung zwischen „relaxed circular“ (rc) und „covalently closed circular“ (ccc) DNA lässt sich somit bewerkstelligen (Bowden, et al. 2004).

Die quantitative Bestimmung der intrahepatischen HBV-cccDNA kann in ca. 75% der Fälle eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung des Hepatitis-B-Virus ermöglichen und somit zur Bestimmung des Behandlungsendpunktes mit herangezogen werden (Sung, et al. 2005). Darüber hinaus weisen einige Arbeiten auf einen zusätzlichen Vorteil der kombinierten Bestimmung der HBV-cccDNA und der prägenomischen-RNA-Konzentration bezüglich der viralen Aktivität und Phase der HBV-Infektion hin (Laras, et al. 2006).

Im Gegensatz zur schnellen und effizienten Senkung der Viruslast im Serum bleibt die Konzentration der intrahepatische HBV-cccDNA von der Wirkung der antiviralen Therapie zunächst unbeeinflusst (Dandri, et al. 2000). Erst durch die dauerhafte Hemmung der viralen DNA-Synthese im Rahmen einer antiviralen Langzeittherapie wird die Konzentration an zytoplasmatischen Viruskapsiden gesenkt. Dadurch stehen weniger Kapside zur Verfügung, die nach Einschleusung in den Zellkern den „Pool“ der intrahepatischen HBV-cccDNA über einen intrazellulären Infektionsweg aufrechterhalten (Delmas, et al. 2002). Speziell für die Therapie mit ADV konnte gezeigt werden, dass die intrahepatische HBV-cccDNA-Konzentration nach der HBeAg-Serokonversion und nach dem Verschwinden von HBsAg deutlich abnahm, jedoch nicht komplett verschwand (Werle-Lapostolle, et al. 2004). Nach Therapieende kann

von der verbleibenden HBV-cccDNA somit die Reaktivierung der HBV-Infektion ausgehen (Newbold, et al. 1995).

Da die HBV-cccDNA in den Hepatozyten verbleibt, kann ihre Konzentration in der Regel nur über eine Leberbiopsie nachgewiesen werden. Einige Studien zeigten jedoch, dass replikative Zwischenprodukte in mononukleären Zellen (PBMC) auch im Blutserum nachzuweisen sind (Köck, Theilmann, et al. 1996). Bei Patienten mit hoher Viruslast wurde HBV-cccDNA und virale pgRNA in diesen Zellen nachgewiesen (Stoll-Becker, et al. 1997). Da die Konzentration von HBV-cccDNA und pgRNA in den mononukleären Zellen von der antiviralen Therapie relativ unbeeinflusst bleibt (Lu, et al. 2009), könnten diese Zellen als extrahepatisches Reservoir dienen und verantwortlich für die Viruspersistenz und Reaktivierung z.B. nach einer Lebertransplantation sein (Brind, et al. 1997).

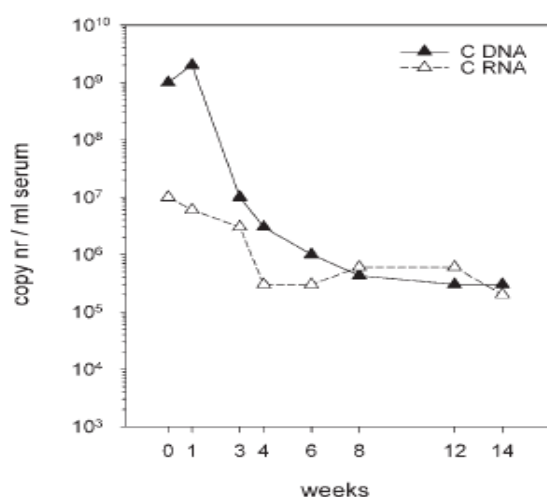
### **1.7.2. HBV-RNA im Serum als potentieller diagnostischer Marker**

Die quantitative Messung der HBV-cccDNA scheint ein guter Anhaltspunkt für die Wirksamkeit der antiviralen Langzeittherapie zu sein, setzt aber im Regelfall eine invasive Diagnostik mit Durchführung einer Leberbiopsie voraus. Surrogatmarker im Serum, die mit der Konzentration der intrahepatischen HBV-cccDNA korrelieren, hätten somit einen hohen klinischen Nutzen. Einzelne Arbeiten konnten eine Korrelation zwischen HBV-RNA im Serum und cccDNA-Konzentration bereits aufzeigen (Rokuhara, et al. 2006). Wie die HBV-RNA ins Serum der Patienten gelangt ist aber weiterhin nicht vollständig geklärt.

Im Gegensatz zur HBV-DNA ist bei der HBV-RNA nicht sicher davon auszugehen, dass sie im Serum in Form von protektiven Nukleokapsiden verpackt vorliegt. Nukleokapside werden erst nach der Hydrolyse der prägenomischen RNA im Rahmen der Transkription zum Plusstrang aus der Leberzelle freigesetzt. (Gerelsaikhan, Tavis und Bruss 1996). Trotzdem kann HBV-RNA im Serum nachgewiesen werden, insbesondere auch dann, wenn andere Replikationsmarker nicht nachweisbar sind. Zum einen wird die Freisetzung viraler RNA aus der vom Immunsystem zerstörten Leberzelle

diskutiert (Black 1980). Zum anderen nimmt die moderne antivirale Therapie direkten Einfluss auf die HBV-RNA-Konzentration im Serum. Bei unbehandelten Patienten liegt der Anteil an RNA-enthaltenden Viruspartikeln bei ca. 1%. Unter einer Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga wie LAM, wird die reverse Transkription und somit die Synthese viraler DNA gehemmt. Dadurch werden Viruspartikel mit koexistierenden DNA- und RNA-Segmenten aufgrund der Selektion dominant (siehe **Abb. 12**) (Zhang, et al. 2003). Patienten mit hohen HBV-RNA-Titern im Serum unter LAM-Therapie neigen zudem zur Mutationsbildung (Hatakeyama 2007).

Ein weiterer Ansatz für die HBV-RNA als diagnostischer Marker ist die Diagnostik der okkulten Hepatitis B und damit einhergehende Transplantationsrisiken. Bei der okkulten Hepatitis können die bisher etablierten serologischen Marker eine HBV-Infektion beim Spender oft nicht detektieren, nach Lebertransplantation in den gesunden Organismus kommt es zur akuten Hepatitis mit hohem Risiko einer chronischen Verlaufsform (Cacciola, et al. 1999). HBx-RNA lässt sich bei diesen inapparent verlaufenden HBV-Infektion im Serum nachweisen und könnte somit helfen, okkult HBV-Infizierte von der Leberspende auszuschließen (Su, et al. 2001).



**Abb. 12: C-segment DNA und RNA Konzentrationen während einer Lamivudin Therapie.** Verglichen wurden Viruskopien, die mittels PCR und RT-PCR nach DNA-Verdau ermittelt wurden (Zhang, et al. 2003).

## 1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Die vollständige Eradikation des Hepatitis-B-Virus ist bislang nicht möglich. An therapeutischen Optionen zur Behandlung der chronischen Hepatitis B stehen Interferone (IFN) und Nukleos(t)id-Analoga zur Verfügung. Beide Medikamentengruppen sind von ihrem therapeutischen Nutzen her limitiert: Die IFN-Therapie hat ein breites Nebenwirkungsspektrum, die Nukleos(t)id-Analoga-Therapie induziert frühzeitig Resistenzmutationen. Die Entwicklung neuer antiviraler Substanzgruppen ist deshalb Gegenstand aktueller Forschung. Bis zum Einsatz nützlicher neuer Medikamente, gilt es die bestehenden Therapiemöglichkeiten zu optimieren. Für den Erfolg der antiviralen Therapie ist zudem eine zuverlässige Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung essentiell. Hierfür bedarf es exakter Testsysteme, zu denen insbesondere molekularbiologische Nachweismethoden gehören.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob der Nachweis von HBV-RNA im Serum von CHB-Patienten möglich ist und inwieweit sich dadurch neue diagnostische Ansätze ableiten lassen. Die enge Korrelation zwischen den im Serum zirkulierenden HBV-RNA-Replikationsintermediaten und der zellkernständigen HBV-cccDNA spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Etablierung der Serum-RNA als Surrogatmarker für die zellkernständige HBV-cccDNA als Indikator der Virusreaktivierung könnte die bisherige bioptische Diagnostik ersetzen.

Die weitere Aufschlüsselung des Pathomechanismus der Nukleos(t)id-Analoga-Resistenzmutationen ist eine Grundvoraussetzung für eine moderne und individualisierte antivirale Therapie. Deshalb soll in molekulargenetischen Untersuchungen geklärt werden, ob antivirale Resistenzmutationen primär durch Selektion über die virale Polymerase (Reverse Transkriptase) entstehen und nur auf Ebene der HBV-DNA nachweisbar sind, oder ob sie z.B. in späten Stadien der HBV-Infektion und unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie auch auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate auftreten. Die Etablierung eines entsprechenden molekulargenetischen Werkzeugs hätte eine hohe klinische Relevanz – mögliche Resistenzmutationen wären hiermit bereits vor dem viralen Durchbruch nachweisbar.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Substanzen und Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich, Roth, und VWR International (Merck) bezogen. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden in bidestilliertem Wasser (Millipore) angesetzt und, falls nötig, autoklaviert oder sterilfiltriert (0,22µm Filtermembran).

##### 10x PBS

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

pH 7,4 mit HCl eingestellt

##### TAE-Puffer

Tris	40 mM,
EDTA	2 mM,
NaCl	5 mM

pH 7,8 mit Essigsäure eingestellt

##### Tris-Puffer

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

##### Stopplösung:

3M NaAcetat pH 5,2	2 µl
100mM EDTA	2 µl
Glycogen	1 µl
dH2O	10 µl

##### Ethidiumbromid

10 µg/ml in 1x TE

#### 2.1.2. Kommerzielle Kits

Taqman MM

Applied Biosystems

QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit

Qiagen

NucleoSpin RNA-Virus

Macherey Nagel

HotStart TaqDNA Polymerase

Fermentas

Superscript II Reverse Transkriptase

Invitrogen

ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kit v2.0

Applied Biosystems



QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
TURBO DNA-free Kit	Applied Biosystems

### 2.1.3. Enzyme

Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs
DNase-I	Roche
Proteinase K	Qiagen
Shrimp Alkaline Phosphatase	GE Healthcare
Exonuclease I	New England Biolabs
RNaseA	Boehringer Mannheim

### 2.1.4. DNA-Standards

Lambda pUC Mix Marker 4	Fermentas
Lambda pUC Mix Marker 8	Fermentas

### 2.1.5. 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.

### 2.1.6. Geräte- und Zubehör

Elektrophoresekammer für Agarosegele: Owl	Peqlab
Feinwaage MC1	Sartorius
Kapillarsequenzierer ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Magnetrührer	Heidolph
Photometer: SmartSpec 3000	Bio-Rad
pH-Meter pH 525	WTW
Pipetten	Gilson
Sterilwerkbänke LaminAir HB2448	Haraeus

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
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
7300 Real Time PCR	Applied Biosystems

### 2.1.7. Oligonukleotide

Zweck	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 1:** Primer für Standard-PCR im HBV-S-Gen

Name	Sequenz
HBV-580F	5'-GCC TCG CAG ACG CAG ATC-3'
HBV-643R	5'-ACA TTG AGA TTC CCG AGA TTG AG-3'
HBV-Taqprobe	5'-(FAM)-CCA TCG CCG CGT CGC AGA AG-(TAMRA)-3'

**Tab 2:** Taqman-Primer und Probe zur HBV-DNA-Quantifizierung

Name	Sequenz
HBV 1456 s	5'-CTG TAT CTT CCT GCT GGT GGC T-3'
HBV 2684 as	5'-GCA GTA TGG ATC GGC AGA GGA-3'

**Tab 3:** Primer für die Sequenzierung der HBV-DNA zur Genotypisierung und Mutationsanalyse

Zweck	Name	Sequenz
1. PCR	b	5'-GGC TCC TCT GCC GAT CCA TA -3'
	c	5'-GGC GAC ACT CCA TAG A-3'
2. PCR	d	5'-TGC CAA CTG GAT CCT (G/T)CG CGG GAC GTC CT-3'
	e	5'-ATA GAT CGA ATT CGC GGC CGC-3'
RT	A	5'-GGC GAC ACT CCA CCA TAG ATC GAA TTC GCG GCC GCT TTTTTTTTTTTTTTTVN-3'
	f	5'-CTG ATG GGC CGT TCA CGG TGG TCT TCC ATG-3'
	g	5'-TAC GTC CCG TCG GCG CTG AAT CCY GCG GAC GAC CCY TCT C-3'

**Tab 4:** Primer für HBV-RACE-PCR

Zweck	Name	Sequenz
1. PCR	HBV2003s	5'-GCA CCT GTA TTC CCA TCC C-3'
	HBVc	5'-GGC GAC ACT CCA TAG A-3'
2. PCR	HBV 2046s	5'-CCT ATG GGA GTG GGC CTC AGT-3'
	HBVe	5'-ATA GAT CGA ATT CGC GGC CGC-3'
RT	A (Lock Docking-Primer)	5'-GGC GAC ACT CCA CCA TAG ATC GAA TTC GCG GCC GCT TTTTTTTTTTTTTTTVN-3'

**Tab 5:** Primer für HPo-RACE-PCR

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Studiendesign und Datenerhebung

Im Rahmen des Forschungsprojekts wurde auf Daten der diagnostischen Abteilung des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen zurückgegriffen. Die ermittelten Ergebnisse der HBV-Genotypisierung und Mutationsanalyse bei Lamivudin und Adefovir- Therapieresistenz standen dem vorliegenden Forschungsprojekt somit unmittelbar zur Verfügung. Es wurde kein zusätzliches Patientenmaterial benötigt.

Die Ergebnisse der HBV-Genotypisierung, Mutationsanalyse und Bestimmung der HB-Viruslast der 67 Patienten, sowie weitere vollständig anonymisierte Patientendaten wurden für eine retrospektive, statistische Auswertung genutzt. In die Auswertung miteinbezogen wurden das Alter, Geschlecht, Therapiebeginn, die Viruslast vor und während der Behandlung, leberspezifische Parameter wie der Transaminasewert GPT, sowie weitere spezifische serologische Parameter wie der HBeAg- und anti-HBeAg-Status. Die Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software „SPSS“ (<http://www.ibm.com/software/de/analytics/spss/>). Die Variablen wurden in einem T-Test oder Exakten Test nach Fisher auf ihre Korrelation geprüft. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Die Untersuchung wurde retrospektiv und ohne aktuelle personenbezogene Nachfrage durchgeführt. Die Auswertung der Daten und Proben wurde dem Projekt 297/2005 der Ethikkommission Tübingen zugeordnet. Nach Rücksprache mit dem Promotionsbüro des Studiendekanats und der Ethikkommission (Leitung Prof. Dr. Luft) war ein eigenständiges Ethikvotum nicht notwendig.

### 2.2.2. HBV-DNA-Extraktion und quantitative PCR

Aus EDTA-Blut von Patienten mit CHB wurde mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit die HBV-DNA nach Herstellerangaben isoliert und unter Verwendung einer nested-PCR (siehe 2.1.7, **Tab 1**) nachgewiesen. Anschließend wurde die HBV-

DNA für die Genotypisierung und die Identifizierung der Mutationen unter Verwendung spezifischer Primer mit dem ABI PRISM 310-Kapillarsequenzierer sequenziert (siehe Kap. 2.2.5).

Für die Bestimmung der HBV-DNA-Konzentration wurde eine quantitative TaqMan<sup>®</sup>-PCR durchgeführt (qPCR). Der Amplifikationsbereich dieser HBV-TaqMan PCR lag im Core-Gen des HBV-Genoms.

Zu 2,5µl DNA-Ansatz wurden 12,5µl *TaqMan Universal Mastermix* (Applied Biosystems), je 1µl der Primer HBV-580F/HBV-643R, 1 µl HBV-Taqprobe, (siehe Kap. 2.1.7, Tab 2), sowie 7µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Die qPCR wurde nach dem unten aufgeführten Protokoll durchgeführt (siehe **Tab 6**). Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgte absolut anhand einer Plasmid-Standardkurve (Verdünnungsreihe pHBV adw2 1,28 Plasmid, Bock 2001). Bei einer Genomgröße von ca. 3,2 kbp des HBV-Genoms entsprachen 10pg Plasmid  $2,8 \times 10^6$  HBV-Kopien. Mittels der Standardkurve wurde die Ausgangskonzentration der Proben berechnet. Die PCR-Reaktion und Detektion der Fluoreszenz erfolgte im 7300 Real Time PCR System der Firma Applied Biosystems.

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

**Tab 6:** PCR-Protokoll der quantitativen TaqMan-PCR

### 2.2.3. Extraktion von HBV-RNA aus Blutserum

Ausgangsmaterial zur Extraktion der HBV-RNA war Blutserum. Die Serumröhrchen lagen anonymisiert und beschriftet vor und wurden bei -80° C tiefgefroren gelagert. Vor Extraktion der HBV-RNA wurden die Proben langsam bei 37° C im Wasserbad aufgetaut und gevortext. Die Extraktion erfolgte mit dem Kit Nucleo Spin RNA-Virus (Macherey Nagel) nach Herstellervorgaben. Die in 150µl Serum enthaltenen Viruskapside wurden durch Hinzufügen von 600µl Lysepuffer RAV1 (Guanidinisothiocyanat) und 20µl Proteinase K

aufgespalten. Die im Lysepuffer enthaltene Carrier-RNA sorgte für ein optimiertes Extraktionsresultat, unter Guanidinisothiocyanat kam es zu einer ausreichenden Deaktivierung störender RNasen. Der Aufspaltungsprozess fand bei 70°C in einem Thermomixer statt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min wurden die Proben entnommen. Um die Anbindungskonditionen an die RNA-adsorbierende Silikamatrix anzupassen wurden 600µl EtOH(100%) hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde die Suspension 10-15 Sekunden kräftig gevortext. Die Säulen mit der Silicon-Gel-Bindungsmembran wurden aufgrund der geringen Volumenkapazität 2mal hintereinander mit 700µl lysierter Probe beladen und abzentrifugiert (1 min bei 8000 x g bei RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Die mit viralen Nukleinsäuren beladene Membran wurde dann mehreren Wasch- und Trockenschritten unterzogen. Der erste Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 500µl RAW-Puffer (guanidine thiocyanat, Ethanol) und anschließender Zentrifugation mit 8000 x g für 1 min bei RT. Bei diesem Schritt wurden DNA-Kontaminationen und PCR Inhibitoren von der Membran entfernt. Beim zweiten und dritten Waschschrift wurden erst 600µl und danach 200µl RAV3-Puffer auf die Säule gegeben und beim ersten Schritt mit 8000 x g für 1 min und beim zweiten Schritt mit 11000 x g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Dadurch wurden Ethanolreste entfernt und die Membran getrocknet. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Zuletzt wurde die in der Säule gebundene und aufgereinigte RNA mit 50µl RNase freiem 70°C warmen destillierten H<sub>2</sub>O eluiert. Danach erfolgte die sofortige Lagerung auf Eis, anonymisierte Beschriftung und dauerhafte Aufbewahrung der Probe bei -80°C.

#### 2.2.3.1. ***DNase- Verdau***

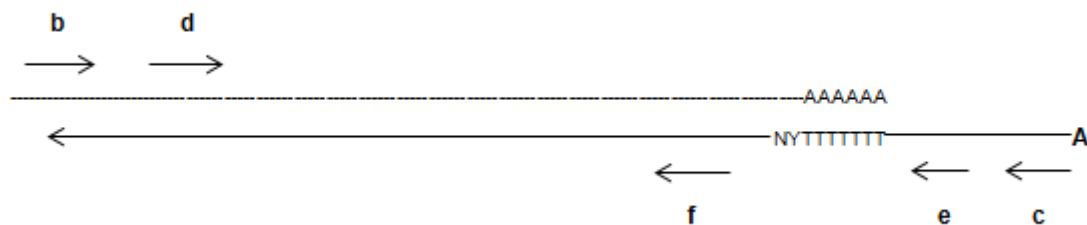
Der DNA-Verdau erfolge mit dem TURBO DNA-free Kit der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Die Turbo-DNase ist eine verbesserte Form der Wildtyp DNase I und zeichnet sich, laut Hersteller, durch eine um 350% gesteigerte katalytische Effizienz aus. Zu der aliquotierten RNA wurden zunächst 5µl des 10x TURBO DNase Puffers, sowie 1µl TURBO DNase gegeben und mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt. Danach wurde das Reaktionsgemisch bei 37°C für 30 min. inkubiert. Anschließend wurde 5µl des

DNase Inaktivierungs-Reagenz addiert und gevortext. Nach 5 min. Inkubationszeit bei RT folgte die Abzentrifugation mit 10.000 x g für 1,5 min. bei RT und Transfer der RNA in ein frisches Behältnis.

## 2.2.4. HBV-RACE-PCR zum selektiven Nachweis der HBV-RNA

### 2.2.4.1. Überblick

Die Methode zum selektiven Nachweis der Hepatitis B Virus-RNA wurde analog der Methodenanleitung von Richard Sallie (Sallie 1994) durchgeführt. Bei der RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) mit selektiver Detektion der HBV-RNA erfolgt die reverse Transkription mit Hilfe eines „Lock-Docking-Primers“ dessen Oligo-T-Sequenz an der polyadenylierten RNA bindet. Die synthetisierte cDNA lässt sich somit bedingt durch die spezifische Sequenz am Lock-Docking-Primer (Primer A, siehe Kap. 2.1.7, Tab 4) von der viralen HBV-Sequenz differenzieren. Die Primer der 1.PCR und der 2.PCR erfassen spezifisch diese Sequenz und führen zum selektiven Nachweis des RNA-Templates.



**Abb. 13: Schematische Darstellung der HBV-RACE-PCR zur HBV-RNA-Detektion** (Sallie 1994). HBV polyadenylierte RNA cDNA-Synthese mittels oligo (dT) lock-docking primer A, gefolgt von einer nested-PCR-Amplifikation (äußeres Amplikon  $b \times c$ , inneres Amplikon  $d \times e$ ). Die HBV DNA-Detektion ist mit dem Primerpaar  $d \times f$  möglich, die Oligonukleotidsequenzen sind in Kap.2.1.7, Tab 4 tabellarisch aufgelistet.

### 2.2.4.2. cDNA-Synthese für HBV-RACE-PCR

Die Reverse Transkription der extrahierten HBV-RNA (siehe 2.2.3) erfolgte mit dem Superscript II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die Reagenzien 5x First-Strand-Buffer, DTT 0,1M, RNaseOUT, Superscript RT wurden dem Kit entnommen, der Lock-Docking-

Primer (Primer A, siehe Kap. 2.1.7, **Tab 4**) wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) kommerziell erworben. Es wurden folgende Komponenten in ein Nuklease-freies Röhrchen pipettiert: 3µl Lock-Docking Primer A (10pmol/µl), 1µl dNTP Mix (25mM), 3µl RNase freies Wasser und 5µl HBV-RNA-Template. Danach wurde im Thermocycler das Gemisch in einer Annealing-Reaktion auf 65°C für 5 min erhitzt. Es folgte ein schnelles Abkühlen im Eisbehälter und Zentrifugation (10.000 x g, 20sec bei RT). Anschließend wurden weitere Komponenten aus dem Kit (s.o.) hinzugegeben: 4µl 5xFirst-Strand-Buffer, 2µl DTT 0,1M und 1µl RNaseOUT (40units/µl). RNaseOUT ist ein rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor für RNase A, B und C und verhindert den Abbau der RNA während der Reaktion. Es folgte gründliches mixen im Vortex-Mixer, sowie anschließend eine Inkubation bei 42°C für 2 min. Nach Hinzugabe von 1µl SuperScript II RT wurde das Reaktionsgemisch gründlich geschwenkt. Danach wurde der Reaktionsansatz bei 42°C für 50 min. inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptions-Reaktion erfolgte bei 70°C für 15 min. Die zur Weiterverarbeitung aufbereitete cDNA wurde aliquotiert, beschriftet und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.4.3. ***RNase-Verdau***

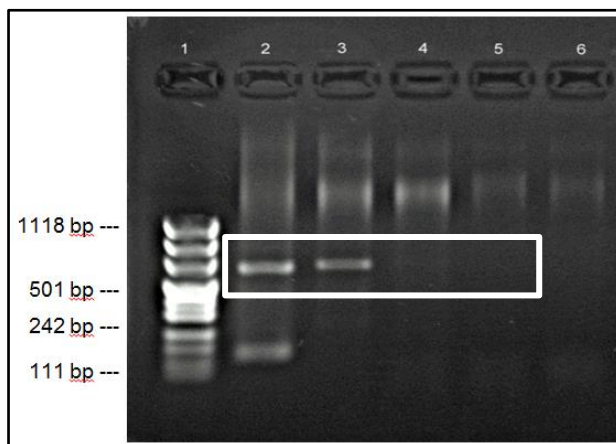
Im Rahmen der Kontrollexperimente wurde die aus Patientenserum extrahierte RNA vor Umschreibung in die cDNA entfernt. Hierfür wurde zu 50µl Reaktionsansatz 1,5µl RNase A (10µg/mL Stock-Lösung) beigefügt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5µl 3M Natriumacetat (pH 6.8) und 100µl Isopropanol hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g unter RT mit Ablagerung eines DNA-Pellets. Der Überstand wurde abgeschüttet und die getrocknete DNA in 50µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.4.4. ***Spezifität des Lock-Docking-Primer***

Der Lock-Docking-Primer wurde aus der Versuchsanleitung von Sallie et al. für den spezifischen HBV-RNA-Nachweis unverändert übernommen (Sallie 1994).



Um zu zeigen, dass der Lock-Docking Primer (oligo-dT-Primer A) hochspezifisch an die polyadenylierte HBV-RNA bindet, wurden bei zwei der positiven HBV-RNA-Proben (Probe 884 und Probe 6508) vor der reversen Transkription die RNA mit 1,5µl RNase A verdaut (siehe Kap. 2.2.4.3). Ein weiteres Aliquot der gleichen HBV-RNA-Proben (Probe 884 und Probe 6508) wurde als Kontrolle ohne Verdauungsenzym für eine Stunde bei 37°C parallel inkubiert. Beide Ansätze wurden in die HBV-RACE-PCR-Reaktion eingesetzt und die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ablichtung unter UV-Licht dargestellt (siehe **Abb. 14**). Spur 2 und 3 zeigen für beide eingesetzten Proben ein PCR-Produkt mit positiver Bande zwischen 501 bp und 692 bp. Auf Spur 4 und 5 zeigte sich, dass nach RNA-Verdau durch die RNase A das Template der beiden HBV-RNA-Proben wirkungsvoll zerstört wurde und die nachfolgende reverse Transkription und anschließende Amplifikation mittels nested PCR (siehe Kap. 2.2.4.3) kein PCR-Produkt synthetisiert. Es wurde somit gezeigt, dass der Oligo-dT-Primer hochspezifisch an die polyadenylierte HBV-RNA bindet.



**Abb. 14: Nachweis von HBV-RNA mit der nested HBV-RACE-PCR nach Sallie. Spur 1:** DNA-Längenstandard Lambda-pUC Mix Marker 8 **Spur 2,3:** HBV-RNA (HBV-positive Probe 884 und 6508) ohne RNA-Verdau **Spur 4,5:** HBV-RNA (HBV-positive Probe 884 und 6508) mit RNA-Verdau durch RNase A vor der cDNA-Synthese **Spur 6** Negativ-Kontrolle

#### 2.2.4.5. *Nested PCR nach der HBV-RACE-Methode*

Für die PCR-Reaktionen wurde das HotStart TaqDNA Polymerase Kit (Fermentas) verwendet. Es wurden die Primer aus der Methodenanleitung

„selektive Detektion der Hepatitis B Virus-RNA“ (Sallie 1994) verwendet (siehe auch 2.2.4.1). Für die 1. PCR kamen die *Primer b x c* zum Einsatz, für die 2. PCR die *Primer d x e*. Zur Darstellung der genomischen HBV-DNA wurden die *Primer d x f* verwendet (siehe Kap. 2.1.7, **Tab 4**: Primer für HBV-RACE-PCR). Es wurden jeweils 25 Zyklen der 1. und 2. PCR wie in **Tab 7** und **Tab 8** beschrieben, durchgeführt.

einmalig	95 C	2 min
25 Zyklen	95°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	1 min
einmalig	72 C	5 min

**Tab 7:** 1.PCR nach HBV-RACE-Protokoll

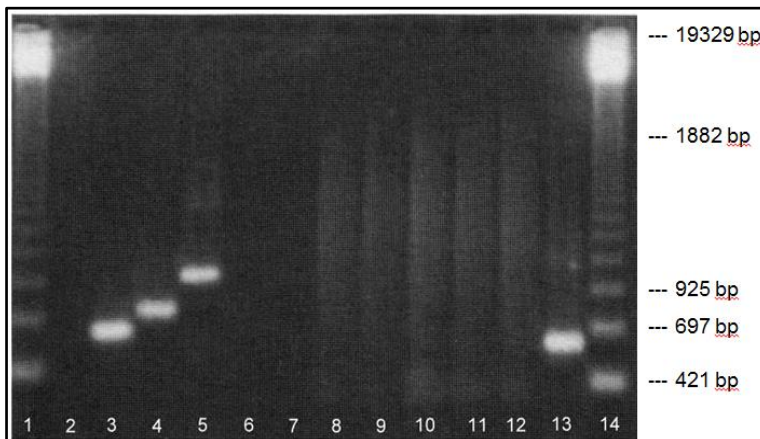
einmalig	95 C	2 min
25 Zyklen	95°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	1 min
einmalig	72 C	5 min

**Tab 8:** 2.PCR nach HBV-RACE-Protokoll

#### 2.2.4.6. **Gel-Elektrophorese der HBV-PCR-Produkte**

Die horizontale Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Zur Herstellung des Lauf-Gels wurde 1g Agarose (Fa.Sigma-Aldrich) in 50ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst. Danach wurde die Lösung in der Mikrowelle für 2 min auf 100°C erhitzt und die Agaroselösung nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 5µl Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen, ca. 15 min ausgehärtet und anschließend mit TRIS-Acetat-EDTA-Puffer überschichtet. Alle Proben wurden mit 1/6 Ladepuffer (6x Orange Loading Dye, Fa. New England Biolabs) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde in einer separaten Spur DNA-Längenstandards aufgetragen, mit einer Größenspannweite von 67-1116 bp (pUC Mix Marker 8, Fermentas) oder von 421-19329bp (pUC Mix Marker 4, Fermentas). Die Elektrophorese fand in einer Elektrophoresekammer für Agarosegele der Firma Peqlab statt. Die angelegte Stromspannung betrug 90V bei einer Laufzeit von 40 min. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Banden unter einer UV-Lichtkamera sichtbar gemacht und nach Bildbearbeitung auf Thermopapier ausgedruckt und digital auf Festplatte abgespeichert.

Wie in **Abb. 15** demonstriert zeigte sich eine spezifische Amplifikation der HBV-RNA, die auch im Rahmen der nachfolgenden Sequenzierung dem HBV zugeordnet werden konnte. Kontrollexperimente mit HBV-RNA-Verdau vor cDNA-Synthese führten erwartungsgemäß zu keiner Amplifikation, gleichfalls konnte durch Weglassen der Komponenten Primer A, Primer c oder Primer d kein Amplifikat erzielt werden. Anhand dieser Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, dass die polyadenylierte HBV-RNA das Template der Amplifikation (wie in Kap 2.2.4.5 beschrieben) darstellt. Die Spezifität der cDNA-Primer *b x c* und nested-Primer *d x e* (siehe Kap. 2.1.7, **Tab 4**) zeigte sich auch anhand des fehlenden Amplifikats bei Verwendung genomischer und oder Plasmid-HBV-DNA als PCR-Template.



**Abb. 15: Gelelektrophorese der HBV RACE-PCR** **Spur 3** HBV DNA PCR- Kontrolle mit Standard Primer (siehe Kap. 2.1.7, **Tab 1**). **Spur 4** Albumin mRNA Kontroll- PCR. **Spur 5** amplifizierte HBV-RNA mit nested Primer (*d x e*, siehe 3.1.7, Tab.4). **Spur 6** PCR nach RNA Verdau vor cDNA-Synthese. **Spur 7-9** PCR jeweils ohne Primer A, c oder d. (siehe 3.1.7, Tab.4) **Spur 10-12** RACE-PCR mit HBV Plasmid-DNA 10, 50 und 100ng (pHBV adw2 1,28). **Spur 13** HBV Plasmid –DNA 10ng mit Standard-Primer (*b x f*, siehe 3.1.7, Tab.4). **Spuren 1,14** DNA-Längenstandard (pUC Mix Marker 8, Fermentas) **Spur 2** Negativ-Kontrolle. (übernommen und modifiziert nach Sallie, et al. 1994)

## 2.2.5. Direkte Sequenzierung

Die Sequenzierung der HBV-DNA wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger, Nicklen und Coulson 1977). Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM BigDye Terminator v30 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Analyse erfolgte mit

dem ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die HBV-Referenzsequenzen wurden aus der Reference Sequence Database (NCBI) (<http://www.ncbi.nih.gov/RefSeq/>) bezogen.

Im ersten Schritt erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte der HBV-RACE-PCR aus Kap. 2.2.4.5. Zu 10µl PCR-Produkt wurden 5µl dH<sub>2</sub>O und 0,5µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 1000U, GE Healthcare) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 2µl 10xExonuklease-Puffer, 0,5µl Exonuklease und 0,5µl dH<sub>2</sub>O ergänzt, gemischt und bei 37°C für 30 min angesetzt. Zur Inaktivierung wurde die Temperatur für weitere 15 min auf 85°C erhöht und anschließend der Ansatz auf 8°C abgekühlt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden dann in einer Sequenzierungs-PCR Reaktion amplifiziert (siehe **Tab 9**). Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 0,5-7µl cDNA, 1µl Primer (10 pmol), 2µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt. Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die PCR-Produkte mit einer Ethanol-Fällung direkt auf einer 96-well-Platte nochmals gereinigt. Zunächst wurde 15µl einer Stopplösung (siehe Kap. 2.1.1) zum Reaktionsansatz hinzugegeben, danach 60µl kaltes 100%iges EtOH (-20°C). Nach vortexen folgte eine Zentrifugation bei 4°C bei 3400 x g für 20 min. Der Überstand wurde abgekippt und die Pellets anschließend mit 100µl 70%iger EtOH (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 13400 x g für 10 min. erfolgte ein erneuter Waschgang (s.o.). Danach wurde die 96-well Platte umgekehrt und auf Filterpapier bei 300 x g zentrifugiert. Die Pellets aus der Ethanolfällung wurden in 20µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen und mit dem ABI PRISM 310-Kapillarsequenzierer analysiert.

Die Auftrennung der entstandenen Abbruchprodukte erfolgte nach ihrer Größe. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotide wurden anschließend mit einem Argonlaser angeregt und die emittierten Signale durch eine CCD-Kamera erfasst. Das Editieren der Sequenzen erfolgte mit dem Programm CEQ-Analyzer von Harlow Scientific. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von Programmen durchgeführt, die den BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) verwendeten. Die Auswertung der Sequenzen durch

Alignment erfolgte mit dem Programm BioEdit von Ibis Biosciences (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>).

Einmalig	96°C	4 min
30 Zyklen	96°C	20 sec
	50°C	20 sec
	60°C	240 sec
dauerhaft	4°C	

**Tab 9:** PCR-Protokoll der Sequenzierungs-PCR

### 2.2.6. Mutationsanalyse

Die HBV-DNA-Sequenz wurde durch einen Sequenzabgleich mit der Gendatenbank NCBI NHI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) genotypisiert und ausgewertet. Zusätzlich wurde das HBV-Polymerasegen, bzw. die reverse Transkriptase, von ihrer Aminosäure 1 bis 344 der viralen Polymerasedomäne (Nummerierung entspricht dem Konsens des HEP DART International Comitee (Stuyver, et al. 2001)) für die Mutationsanalyse auf Basenabweichungen im Vergleich zum jeweiligen Referenzstamm untersucht (siehe **Tab 10**). Die für den Sequenzabgleich verwendeten HBV-Referenzsequenzen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

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.

**Tab 10:** Auflistung der Referenzstämmen für den jeweiligen HBV-Genotyp.

### 3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob antivirale Resistenzmutationen bei Nukleos(t)id-Analoga-Therapie der chronischen HBV-Infektion sich nur durch Selektion auf der HBV-DNA manifestieren, oder ob sie auch auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate nachweisbar sind. Der Nachweis von Resistenzmutationen auf anderen Replikationsintermediaten als der HBV-DNA hätte weitreichende Konsequenzen für die Diagnostik und Monitoring der antiviralen Therapie der chronischen Hepatitis B (CHB). Dies könnte zum frühzeitigen Nachweis eines Therapieversagens maßgeblich beitragen.

Zur Bearbeitung dieser wissenschaftlichen Fragestellung wurden aus einer bundesweiten Studie 67 CHB-Patienten ausgesucht, die trotz einer Therapie mit den Nukleos(t)id-Analoga Lamivudin oder Adefovir anhand des klinischen Verlaufs eine Therapieresistenz zeigten.

Die anonymisierten klinischen Daten der Patienten wurden tabellarisch gelistet und systematisch analysiert (siehe Kap.3.1.1). Anschließend wurde eine Untersuchung bezüglich des HBV-Genotyps durchgeführt (siehe Kap. 3.1.3). Um die HBV-RNA im Serum nachweisen und sequenzieren zu können, wurde eine hochspezifische und hochsensitive HPo-RACE-PCR (HBV-Polymerase spezifische RACE-PCR) entwickelt (siehe Kap. 3.2). Die HBV-Sequenzen wurden einer Mutationsanalyse unterzogen, wobei Resistenzmutationen im YMDD-Motiv der HBV-Polymerase auf HBV-DNA und auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate analysiert und miteinander verglichen wurden (siehe Kap. 3.3).

### **3.1. Genotypische Analyse der Selektion von Resistenzmutationen des Hepatitis-B-Virus**

#### **3.1.1. Analyse von klinischen Datensätzen bei vollständig anonymisierten HBV-Isolaten**

In den letzten Jahren haben sich die Ziele der medikamentösen Therapie der CHB grundlegend gewandelt. Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Höhe der Transaminasen kein zuverlässiger Parameter der Krankheitsaktivität darstellt, mussten neue Surrogatmarker zur Überprüfung des Therapieerfolgs entwickelt werden (Brunetto, et al. 2002). Entsprechend der aktuellen Leitlinie zur Therapie der HBV-Infektion von 2011 liegt der Schwerpunkt deshalb heute in einer dauerhaften Suppression der HBV-DNA-Konzentration unter 2.000 IU/ml, oder im Idealfall unter die Nachweisgrenze (S3-Leitlinie HBV, Cornberg et al. 2011). Als langfristiges Ziel wurde zudem die Serokonversion von HBs-Antigen zu Anti-HBs-Antikörpern, eine dauerhafte GPT-Normalisierung, die Abnahme des Fibroestadiums und der entzündlichen Aktivität in der Leber definiert. Dadurch soll frühzeitig das Risiko eine Leberzirrhose und die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms verhindert werden.

Aufgrund des breiten Nebenwirkungsspektrums der IFN-Therapie, werden derzeit hauptsächlich Nukleos(t)id-Analoga zur Therapie der CHB eingesetzt. Das Auftreten von Resistenzmutationen ist insbesondere beim Einsatz von Substanzen mit niedriger Resistenzbarriere wie Lamivudin (LAM) und Adefovir (ADV) deutlich erhöht (Chang, Gish und De Man 2006) (Marcellin, Heathcote, et al. 2008). Die Erforschung dieses Phänomens ist bis heute noch nicht abgeschlossen und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Insgesamt wurden 67 Serumproben von CHB-Patienten untersucht, die anhand klinischer Parameter wie HBV-DNA-Konzentration oder Transaminasenanstieg die Voraussetzungen einer virologischen oder biochemischen Resistenz gegenüber der Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga erfüllten. 37 Proben stammten von Patienten, die mit einer LAM-Monotherapie behandelt wurden und 30 Proben von Patienten mit ADV-Monotherapie und LAM-Vorbehandlung. Die Daten wurden retrospektiv und in anonymisierter Form analysiert und im

Sinne einer historischen Studie ausgewertet. Die Auswertung der Daten und Proben wurden dem Projekt 297/2005 der Ethikkommission Tübingen zugeordnet. Nach Rücksprache mit dem Promotionsbüro des Studiendekanats und der Ethikkommission (Prof. Dr. Luft) war ein eigenständiges Ethikvotum nicht notwendig.

Die Altersverteilung der Patienten lag zwischen 14-70 Jahre, der Mittelwert betrug 45 (SD+/-14) Jahre. 42/67(63%) Patienten waren männlich, 14/67(21%) Patienten weiblich. Bei 11/67(16%) der Patienten war das Geschlecht nicht angegeben. Durchschnittlich wurde 2,8 (SD+/-1,8) Jahre mit einem Nukleos(t)id-Analogen behandelt. Eine HBeAg-positive CHB wiesen 29/67 (43%) der Patienten auf (siehe **Tab 11**). Bei allen Patienten zeigten sich ein schlechtes Therapieansprechen und ein progredienter Verlauf der CHB mit einem mittleren GPT-Wert von 104 IU/l (SD+/-188 IU/l) und einer mittleren HBV-DNA-Konzentration von  $3,0 \cdot 10^6$  IU/ml (+/- $1,2 \cdot 10^7$  IU/l).

Bei 37 Patienten bestand zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Monotherapie mit LAM, eine Vortherapie mit IFN war bei 3/37(8%) Patienten bekannt. 30 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung mit ADV behandelt, davon hatten 20/30(67%) Patienten eine Vortherapie mit LAM.

n=67	
Alter (Jahre, +/- SD)	45 (+/-14)
Geschlecht	m 42/67 w 14/67
Therapiedauer (Jahre, +/- SD)	2,8 (+/-1,8)
GPT (IU/l, +/- SD)	104 (+/-188)
HBV-DNA-Konzentration (IU/ml)	$3,0 \cdot 10^6$ (+/- $1,2 \cdot 10^7$ )
Positiver HBe-Ag-Status	29/67 (43%)

**Tab 11: Tabellarische Auflistung der Basisdaten von Patienten mit einer CHB unter Nukleos(t)id-Therapie.** Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung (+/-SD). Alter, Geschlecht, mittlere Therapiedauer, mittlere GPT-Aktivität, mittlere HBV-DNA-Konzentration, sowie HBe-Ag-Status wurden dem ärztlichen Einsendeschein entnommen. m = männlich, w = weiblich.



### 3.1.2. Genotypische Analyse der Reversen-Transkriptase-Region des Hepatitis-B-Virus

Eine hohe Virusreplikationsrate und die fehlende „proof-reading“-Funktion der viralen Polymerase des HBV begünstigen die Entwicklung von Mutationen im HBV-Genom. Im Rahmen der Resistenzmutations-Diagnostik wurden insgesamt 67 Serum-Proben von Patienten mit einer CHB und Nukleos(t)id-Therapie molekularpathologisch untersucht. Nach HBV-DNA-Extraktion und HBV-DNA-PCR wurden die Amplifikate auf patientenspezifische Isolate und HBV-Genotypen mittels direkter DNA-Sequenzierung untersucht, zudem erfolgte ein Sequenzabgleich auf mögliche Mutationen in der HBV-RT-Domäne mit HBV-Referenzsequenzen (siehe Kap 2.2.1).

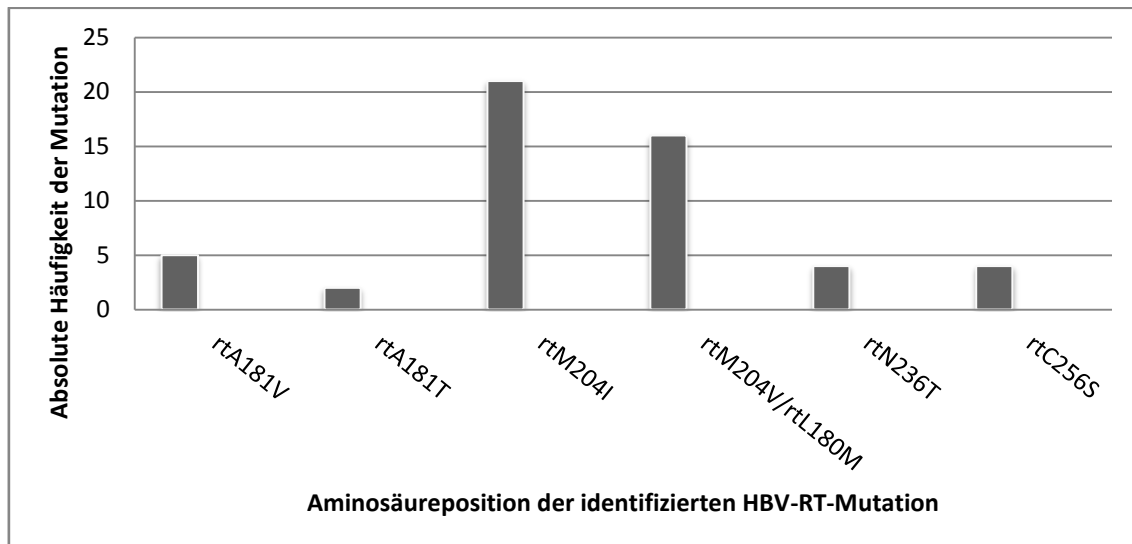
Identifizierte Mutationen waren die publizierten LAM-Resistenzmutationen rtM204I/V/S (Allen, et al. 1998), die im katalytischen Zentrum (YMDD-Motiv) der reversen Transkriptase lokalisiert sind, die Mutation rtL180M (Bock, Tillmann, et al. 2002) in der B-Domäne und die potentielle LAM-Resistenzmutation rtC256S (Lai, Dienstag, et al. 2003).

Die Patienten mit ADV-Therapie wurden zudem auf die bekannten ADV-Resistenzmutationen rtA181V/T (Angus, et al. 2003) und rtN236T (Borroto-Esoda, et al. 2006) untersucht. Die von den HBV-Referenzstämmen (z.B. Z72478 Valenzuela et al. für HBV-Genotyp A, siehe Kap. 2.2.1, **Tab 10**) abweichenden Basen der HBV-RT-Domäne wurden detailliert ausgewertet und die Häufigkeiten bestimmt (siehe **Abb. 16**).

Bei Betrachtung der Gesamtzahl der HBV-Serumproben (n=67) mit aktueller oder vorausgegangener LAM-Therapie, zeigte sich bei 41/67(61%) Patienten eine mit der LAM-Resistenz assoziierte Mutation. Von diesen 41 Patienten zeigten 21/41(51%) die YMDD-Mutation rtM204I (YIDD). Bei 16/41(39%) der Patienten konnte das Kombinationsresistenzmuster rtM204V(YVDD)/rtL180M nachgewiesen werden. Die Mutation rtC256S wurde bei 4/41(10%) Patienten diagnostiziert.

Eine ADV-assoziierte Resistenzmutation zeigte sich bei insgesamt 11/30(37%) Patienten mit ADV-Therapie. Von diesen 9 Patienten hatten 5/11(46%) eine rtA181V-Resistenzmutation, 2/11(18%) Patienten hatten die Mutation rtA181T

und 4/11(36%) die Mutation rtN236T. In der Gruppe der Patienten mit einer ADV-Monotherapie und LAM-Vorthherapie zeigte sich bei 8/20(40%) dieser Patienten eine LAM-Resistenzmutation.



**Abb. 16: Darstellung der absoluten Häufigkeiten einzelner Mutationen in der reversen Transkriptase (RT) Region des HBV-Genoms.** Die Mutationen rtL180M, rtM204I/V, sowie rtC256S sind als Resistenzmutationen unter LAM-Therapie beschrieben. Die Mutationen rtA181V/T und rtN236T werden durch eine Therapie mit ADV selektioniert.

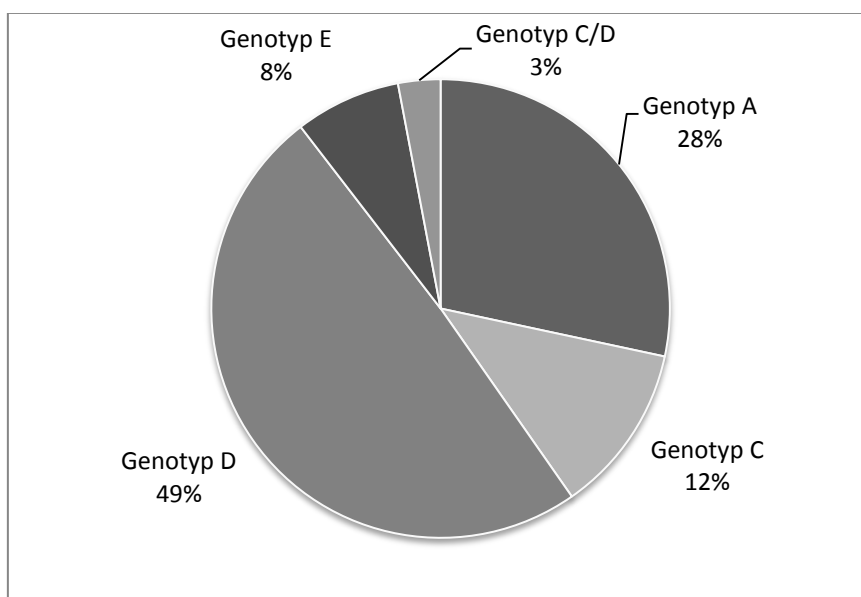
### 3.1.3. Analyse der Genotypen-Prävalenz bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B

Das humane Hepatitis-B-Virus ist in acht Genotypen A-H aufgegliedert. Unter diesen Genotypen besteht eine Sequenzdifferenz von 8-17% (Norder, Courouce und Magnus 1994). Es besteht ein geographisches Verteilungsmuster (siehe Kap. 1.1.3, Abb. 1). Genotyp A lässt sich am häufigsten in Nord- und Mitteleuropa, sowie den USA nachweisen, die Genotypen B und C treten prädominant in Asien auf (Liu, Kao und Chen 2005). Genotyp D dominiert vor allem bei HBV-Infizierten aus dem Mittelmeerraum, Mittleren Osten und Indien. In Zentral- und Osteuropa sind die Genotypen A und D zu ungefähr gleichen Anteilen vertreten (42% und 48%). In Deutschland kommt einer neuen Studie zufolge am häufigsten der HBV-Genotyp D vor (58%), gefolgt von Genotyp A (32%) (Deterding, et al. 2008).

Zur Bestimmung des HBV-Genotyps wurde bei dem untersuchten Patientenkollektiv (67 HBV-Isolate) die HBV-DNA mittels nested PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Kap. 2.2.1). Danach wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt und die Sequenzfolge mit der Gendatenbank NCBI NHI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) abgeglichen.

Für den HBV-Genotyp D zeigte sich mit 33/67 (49%) die höchste Prävalenz (siehe **Abb. 17**), gefolgt von Genotyp A mit einer Prävalenz von 19/67 (28%). Genotyp C wurde mit 8/67 (12%) und Genotyp E mit 5/67 (8%) nachgewiesen. Die HBV-Genotypen B, F und H konnten bei diesem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der zu erwartenden Genotyp-Verteilung für Deutschland (siehe **Tab 12**), die in der Prävalenzstudie von Deterding et al. bereits beschrieben wurde (Deterding, et al. 2008).



**Abb. 17: Grafische Darstellung der Verteilung der HBV-Genotypen im untersuchten Patientenkollektiv.** Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten (n=67). Bei 2 Proben konnte anhand des BLAST-Algorithmus der HBV-Genotyp (C/D) nicht ausreichend differenziert werden.

	<i>Genotyp A</i>	<i>Genotyp C</i>	<i>Genotyp D</i>	<i>Genotyp E</i>	<i>Gen. mixed</i>
<b>Patientenkollektiv (n=67)</b>	19 (28%)	8 (12%)	<b>33 (49%)</b>	5 (8%)	2 (3%)
<b>Deterding et al. (n=133)</b>	43 (32%)	7 (5%)	<b>78 (58%)</b>	1 (1%)	1 (1%)

**Tab 12: Prävalenz der HBV-Genotypen für Deutschland.** Erste Zeile: Auflistung der Prävalenzdaten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HBV-Proben (n=67). Zweite Zeile: Auflistung der Prävalenzdaten von Deterding et al (2008) für Deutschland (n=133).

### 3.1.4. Analyse des Effektes der Nukleos(t)id-Analoga-Therapie auf virologische und biochemische Resistenzparameter

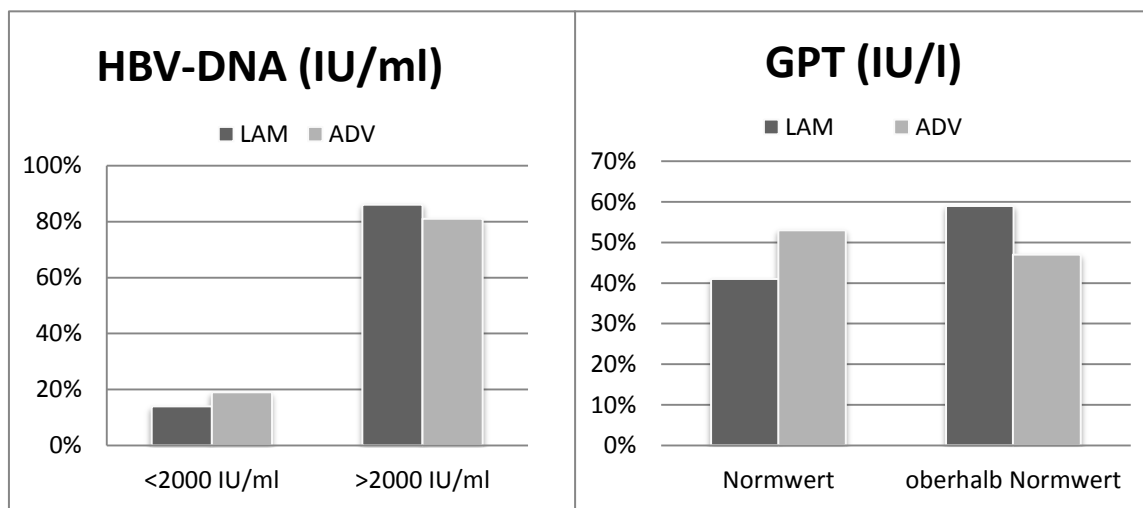
Wichtigster virologischer Parameter der Resistenzentwicklung gegenüber der antiviralen Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga ist die HBV-DNA-Viruslast. Ein biochemischer Parameter der Resistenzentwicklung ist die Enzymaktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Die GPT ist ein Enzym und kommt nur im Zytoplasma der Zelle vor. Das enzymreichste Organ ist die Leber. Auch im Skelettknochen und im Herzmuskel lässt sich die GPT in geringen Mengen nachweisen. Bei einer Schädigung der Leber ist die Konzentration im Plasma erhöht. Der Normwert für Frauen liegt bei <35 IU/l und für Männer bei <45 IU/l. Aufgrund der mangelnden Korrelation der Enzymaktivität zur Virusaktivität und dem zeitlich verzögerten Anstieg nach Resistenzentwicklung ist die GPT-Bestimmung mit der aktuellen HBV-Leitlinie von 2011 in den Hintergrund getreten.

Die HBV-DNA-Konzentration wurde in dieser Arbeit nach HBV-DNA Extraktion aus Patientenserum mit einer Taqman®-PCR bestimmt (siehe Kap.2.2.2). Bei keinem der Patienten aus der LAM- (n=37) und ADV-Gruppe (n=30) lag die HBV-DNA unter der Nachweisgrenze, bei 86% der Patienten mit LAM-Therapie und bei 81% der Patienten mit ADV-Therapie wurde der Grenzwert von 2000 IU/ml überschritten (siehe **Abb. 18**, links). Der Mittelwert der HBV-DNA-Konzentration der Patienten mit einer LAM-Therapie betrug  $4,9 \cdot 10^6$  IU/ml mit einer Spannweite von  $117 - 6,0 \cdot 10^7$  IU/ml ( $SD \pm 1,5 \cdot 10^7$ ) und bei den Patienten

mit einer ADV-Therapie  $3,7 \cdot 10^5$  IU/l mit einer Spannweite von 70 –  $4,8 \cdot 10^6$  IU/l (SD $\pm$ 9,9 $\cdot 10^5$ ).

Die GPT konnte bei 32/37(86%) der LAM-Patienten und bei 26/30(87%) der ADV-Patienten analysiert werden, bei 9 Patienten wurden der GPT-Wert im Einsendeschein nicht angegeben. Bei der Analyse des untersuchten Patientenkollektive lag der Mittelwert der GPT bei der LAM-Gruppe bei 120 IU/l (SD $\pm$ 232) mit einer Spannweite von 11 – 1270 IU/l. Somit befanden sich 41% der Proben der LAM-Gruppe geschlechtsadaptiert im Normbereich und 59% der Proben oberhalb des Normwertes. In der ADV-Gruppe betrug der Mittelwert 85 IU/l (SD $\pm$ 114) mit einer Spannweite von 18 – 515 IU/l. Bei 53% der Proben der ADV-Gruppe lag der GPT-Wert geschlechtsadaptiert im Normbereich und bei 46% der Proben oberhalb des Normwertes (siehe **Abb. 18**, rechts).

In Zusammenschau der Befunde aus HBV-DNA-Konzentration und Enzymaktivität der GPT zeigte sich somit bei 35/37 (95%) der Patienten mit einer LAM-Monotherapie und bei 29/30 (97%) der Patienten mit einer ADV-Monotherapie eine biochemische und virologische Resistenz gegenüber der antiviralen Behandlung.



**Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Parameter HBV-DNA und GPT in der Therapiegruppe ADV und LAM.** Kriterien für ein langfristiges Therapieansprechen sind ein dauerhafter Abfall der HBV-DNA auf <2000 IU/ml und eine dauerhafte GPT-Normalisierung (S3-Leitlinie, Cornberg und al 2011).

Der Vergleich biochemischer und virologischer Resistenzparameter zwischen der LAM- und der ADV-Gruppe, sowie die statistische Auswertung erfolgten mit der Statistik-Software „SPSS“ (<http://www-ibm.com/software/de/analytics/spss/>). Mit einem T-Test wurden die biochemischen Resistenzparameter HBV-DNA und die Enzymaktivität der GPT in den Patientengruppen mit LAM- und ADV-Monotherapie miteinander verglichen. Bezüglich der HBV-DNA unterschieden sich Patienten mit LAM-Therapie nur tendenziell ( $M = 4,9 \times 10^6$  IU/ml,  $SD = 1,5 \times 10^7$  IU/ml) von den Patienten mit ADV-Therapie ( $M = 3,7 \times 10^5$  IU/ml,  $SD = 0,9 \times 10^6$  IU/ml). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $t(36,39) = 1.75$ ,  $p = 0.089$ ).

Nach einem Median-Split (Median der Variable HBV-DNA- Konzentration = 28.000 IU/l) zeigte sich zudem, dass in der Gruppe der Patienten mit einer HBV-DNA-Konzentration unter 28.000 IU/l die beiden verglichenen Medikamente LAM ( $M = 11.239$  IU/ml,  $SD \pm 10.181$ ) und ADV ( $M = 6.259$  IU/ml,  $SD \pm 5.476$ ) keinen signifikanten Unterschied aufwiesen ( $t(25) = 1,74$ ,  $p = 0.095$ ). In der Gruppe oberhalb des Medians von 28.000 IU/l zeigte sich für LAM ( $M = 9,5 \times 10^6$  IU/ml,  $SD \pm 2,1 \times 10^7$ ) und ADV ( $M = 763.133$  IU/ml,  $SD \pm 1,3 \times 10^6$ ) ebenfalls kein signifikanter Unterschied ( $t(18) = 1,80$ ,  $p = 0,088$ ).

Bei dem Vergleich der Enzymaktivität der GPT zwischen der LAM- ( $M = 120$  IU/ml,  $SD \pm 41$ ) und der ADV-behandelten Gruppe ( $M = 85$  IU/ml,  $SD \pm 22$ ) konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis ermittelt werden ( $t(56) = 0.694$ ,  $p = 0,490$ ).

Zusammengefasst zeigte die statistische Untersuchung keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der LAM- und ADV-Gruppe bezüglich ihrer Auswirkung auf die virologischen (HBV-DNA-Last) und biochemischen Resistenzparameter (Enzymaktivität der GPT) der untersuchten Proben.

## **3.2. Etablierung einer HBV-Polymerase spezifischen RACE-PCR (HPoRACE-PCR) zum Nachweis von HBV-RNA-Molekülen**

### **3.2.1. Überblick**

Die selektive Darstellung von RNA in einem RNA/DNA-Gemisch kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Eine häufig verwendete Methode ist es, PCR-Primer auszuwählen, die sich über ein oder mehrere Introns spannen. Nachfolgend lässt sich im Rahmen der Elektrophorese anhand der Länge des PCR-Produktes zwischen RNA und DNA-Amplikon unterscheiden. Da das HBV-Genom aber keine Intronstruktur besitzt, kommt die genannte Methode der intronüberspannenden Primer nicht in Betracht.

Eine weitere Möglichkeit ist der enzymatische DNA-Verdau mit Hilfe einer spezifischen DNase vor der RT-PCR-Reaktion. Ein vollständiger Verdau des HBV-DNA-Moleküls ist aufgrund dessen Stabilität meist nicht zuverlässig durchzuführen.

Bei initialen Versuchen in dieser Arbeit konnte trotz hochpotenter DNase-Enzyme die vollständige Elimination der HBV-DNA in den Kontroll-PCRs mit hochempfindlichen Primer nicht sicher gewährleistet werden. Weiterhin verursacht die zur Enzymaktivierung notwendige Arbeitstemperatur der DNase (37°C) hitzebedingte Schäden am RNA-Template und führte zum Misslingen der reversen Transkription.

### **3.2.2. Adaption der RACE-PCR Technik**

Eine bessere Möglichkeit zur selektiven Darstellung von HBV-RNA in einem RNA/DNA-Gemisch bietet die RACE-PCR Technik (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds). Bei der RACE-PCR werden in der Regel drei Primer benötigt. Einer für die cDNA-Synthese und zwei für die nachfolgende PCR-Reaktion (Frohman 1994). Die reverse Transkription und HBV-cDNA-Synthese erfolgt mit Hilfe eines „Lock-Docking-Primers“ an dessen 5' Ende sich eine Oligo(dT)-Sequenz und am 3' Ende „multiple cloning sites“ (mcs) befinden. Im Rahmen

der reversen Transkription bindet der Oligo(dT)-Anteil an den Poly(A)-Schwanz des RNA-Transkripts. Es werden dadurch cDNA-Produkte synthetisiert, die die spezifische mcs-Region enthalten und sich somit von der genomischen DNA unterscheiden lassen (siehe Kap. 2.2.4.2). Der „downstream“ Primer enthält die korrespondierende mcs-Region, der „upstream“ Primer ist wiederum spezifisch für eine bekannte Region der cDNA (Borson, Salo und Drewes 1992) (siehe auch **Abb. 19**).

Zur selektiven Darstellung der HBV-RNA wurde von Richard Sallie bereits 1994 eine RACE-PCR mit spezifischen Primer etabliert (Sallie 1994). Diese Methode wurde zum Nachweis und Amplifikation von HBV-RNA in dieser Arbeit genutzt (siehe Kap. 2.2.4.). Zur Darstellung der HBV-Polymeraseregion war eine Verlängerung des PCR-Produkts nötig und wurde durch eine Modifizierung der Methode erreicht. Der Lock-Docking-Primer (LD-Primer A; siehe 2.1.7, **Tab 5**) und der korrespondierende downstream Primer c für die 1. PCR (Primer c= HBVc (siehe 2.1.7, **Tab 5**) bzw. Primer e für die 2. PCR (Primer e= HBVe (siehe 2.1.7, **Tab 5**)) konnten aus der Methode von Richard Sallie adaptiert werden. Der „upstream“ Primer (Primer b) wurde ersetzt mit dem Primer HBV2003s (siehe 2.1.7, **Tab 5**). Bei der 2. PCR wurde Primer c mit Primer HBV2046s ersetzt (siehe 2.1.7, **Tab 5**). **Abb. 19** zeigt den schematischen Aufbau der neu etablierten HPoRACE-PCR. Die Extension-Zeit der 1.PCR und 2.PCR wurde auf 180 sec (siehe **Tab 13** und **Tab 14**, fett) verlängert, um die Elongationsrate der Taq-Polymerase für das jetzt verlängerte PCR-Produkt auszuschöpfen.

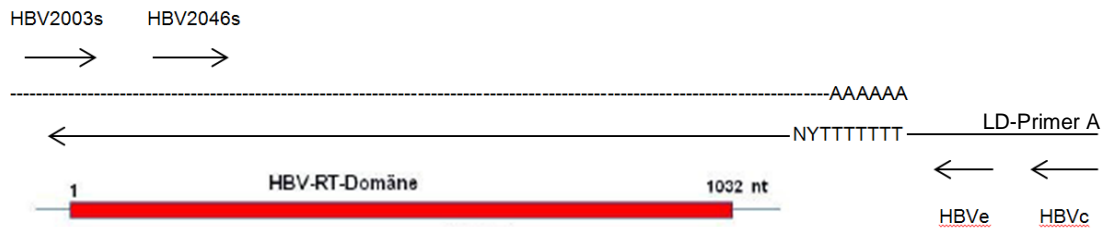
einmalig	95 C	2 min
30 Zyklen	95 C	30 sec
	55°C	30 sec
	72°C	<b>180 sec</b>
einmalig	72°C	5 min

**Tab 13:** HPoRACE-PCR-Protokoll für die 1. PCR

Einmalig	95 C	2 min
30 Zyklen	95°C	30 sec
	55°C	30 sec
	72°C	<b>180 sec</b>
Einmalig	72 C	5 min

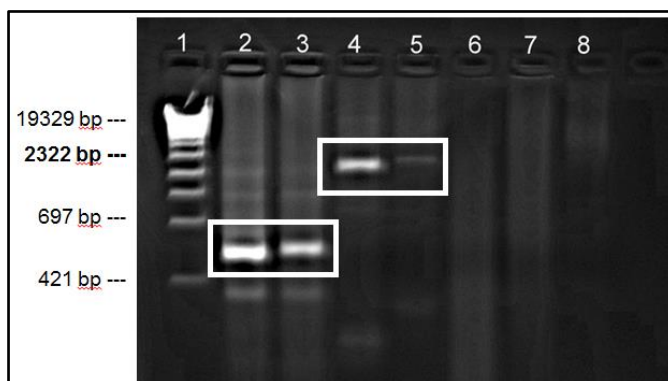
**Tab 14:** HPoRACE-PCR-Protokoll für die 2. (nested) PCR





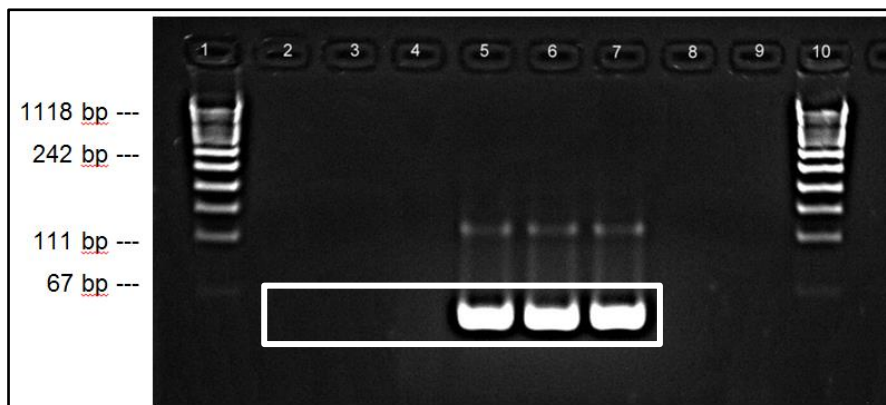
**Abb. 19: Schematische Darstellung der neu etablierten HPoRACE-PCR.** Neu generierte „upstream“-Primer HBV2003s für die 1. PCR und HBV2046s für die 2. PCR. Die polyadenylierte HBV-RNA ist gestrichelt dargestellt. Lock-Docking-Primer A mit oligo(dT)-Anteil. Primer HBVc für die 1. PCR und HBVe für die 2. PCR. Unten: Schematische Darstellung der Lage des HBV-Polymerasegens nt1 bis nt1032.

Um die Validität der unterschiedlichen PCR-Produktlängen der eingesetzten HBV-RACE-PCR Methoden zu überprüfen, wurden zwei HBV-RNA-Proben (Serumprobe 884 und 6508) mit den Primer der HBV-RACE-PCR nach Sallie und den Primer der neu etablierten HPoRACE-PCR (siehe Kap. 2.1.7) in einen Reaktionsansatz gebracht. Die Lokalisation der Banden in **Abb. 20** zeigt die unterschiedliche Fragmentlänge der PCR-Produkte. Anhand des Abgleichs mit dem DNA-Längenstandard (Lambda-pUC Mix Marker 4) ließen sich auf Spur 2 und Spur 3 für die HBV-RNA-Proben, die mit der HBV-RACE-PCR nach Sallie bearbeitet wurden, positive Banden zwischen 421bp und 697bp ablesen. Auf Spur 4 und 5 ließen sich die Banden der verlängerten HBV-PCR-Produkte, die mit der neu etablierten HPoRACE-PCR erstellt wurden, in einem Bereich zwischen 1882bp und 2322bp einordnen.



**Abb. 20: Vergleich der PCR-Produktlänge zwischen HBV-RACE-PCR nach Sallie und der neu etablierten HPoRACE-PCR.** Spur 1: DNA-Längenstandard Lambda-pUC Mix Marker 4 Spur 2,3: HBV-RNA (HBV-positive Probe 884 und 6508) mit nested HBV-RACE-PCR-Primer nach Sallie Spur 4,5: HBV-RNA (HBV-positive Probe 884 und 6508) mit neu etablierten nested HPoRACE-PCR-Primer Spur 6-8: Negativkontrollen

Um nachzuweisen, dass die auf die mcs-Region der cDNA gerichteten Primer der HPO-RACE-PCR nicht an die genomische HBV-DNA binden, wurden im folgenden Versuchsaufbau die HPO-RACE-Primer auf eine Verdünnungsreihe einer WHO HBV-DNA-Standardprobe angewendet. Die Standardprobe wurde vom *National Institut for Biological Standards and Control* bezogen (WHO NIBSC 97/946 1 Mio.IU/ml). Die Standardprobe wurde 1:10, 1:50 und 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in einzelne Reaktionsansätze verteilt. Auf Spur 2-4 (**Abb. 21**) wurden HPO-RACE-PCR-Primer eingesetzt, die spezifisch an die HBV-cDNA mit mcs-Region binden. In der Gelelektrophorese zeigte sich bei allen drei Verdünnungsstufen kein PCR-Amplifikat. Die Kontrolle auf Spur 5-7 (**Abb. 21**) mit Standard-HBV-Diagnostikprimer (Primer *HB134* x *HB135*, bzw. nested Primer *HB75* x *HB94* siehe 2.1.7, **Tab 1**) war für alle 3 Verdünnungsstufen wie erwartet positiv. Der Versuch zeigte somit, dass die HPO-RACE-PCR-Primer hochspezifisch sind und nicht an die genomische HBV-DNA binden.



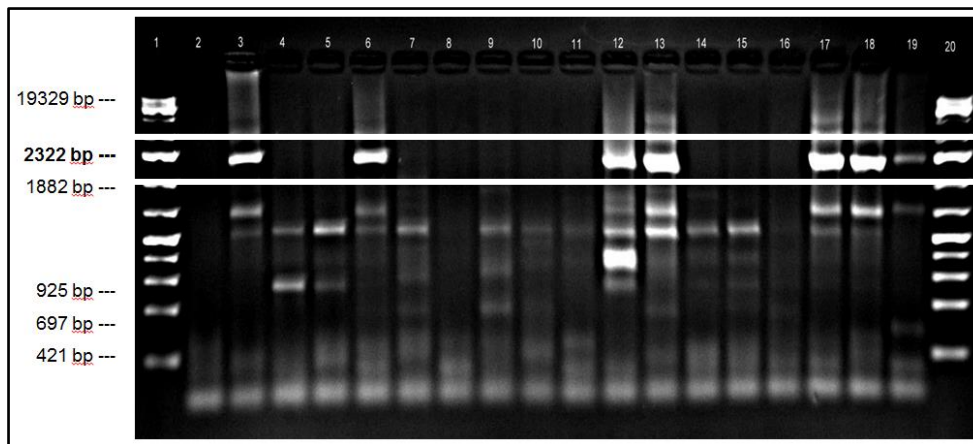
**Abb. 21: Gelelektrophorese nach HPO-RACE-PCR mit HBV-DNA-Standardprobe-Verdünnungsreihe. Spur 1+10:** DNA-Längenstandard Lambda-pUC Mix Marker 8, **Spur 2-4** WHO HBV-DNA-Standardprobe NIBSC 97/946 1:10, 1:50, 1:100, PCR mit nested HPO-RACE-PCR Primer *HBV2046s* x *HBVe* **Spur 5-7:** WHO HBV-DNA-Standardprobe NIBSC 97/946 1:10, 1:50, 1:100, PCR mit nested HBV-PCR Primer *HB75* x *HB94*, **Spur 8,9:** Negativkontrollen

### 3.2.3. Anwendung der neu etablierten HPoRACE-PCR auf das untersuchte Patientenkollektiv

Insgesamt wurden n=61 Serumproben von Patienten mit einer CHB mit der neu etablierten HPoRACE-PCR untersucht (Daten und Proben wurden dem Projekt 297/2005 der Ethikkommission Tübingen zugeordnet). Nach der Extraktion der HBV-RNA aus dem Serum von CHB-Infizierten (siehe Kap. 2.2.3) wurde mit Hilfe des Lock-Docking-Primer-Systems die HBV-RNA in cDNA umgeschrieben, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt (siehe Kap. 2.2.4.2). Anschließend wurde die cDNA in die HPoRACE-PCR eingesetzt und amplifiziert. Für den Nachweis des neuen PCR-Produkts erfolgte die Gelelektrophorese mit Bestimmung der Fragmentlänge anhand bekannter DNA-Längenstandards (siehe **Abb. 22**, Spur 4-19).

Die Nachweisgenauigkeit für HBV-RNA im Serum von Patienten mit einer CHB wurde zwischen der bereits in der Literatur beschriebenen HBV-RACE-PCR (siehe Kap. 2.2.4) und der neu etablierten HPoRACE-PCR verglichen. Mit der bereits beschriebenen Methode konnte bei 18/37 (49%) der LAM-behandelten und bei 14/28 (50%) der ADV-behandelten Patienten ein erfolgreicher HBV-RNA-Nachweis durchgeführt werden (siehe **Tab 15**, linke Spalte). Die neu etablierte HPo-RACE-PCR zeigte eine geringere HBV-RNA-Nachweisquote. Bei 15/33(45%) der Proben mit LAM-Behandlung und bei 10/28(36%) der Proben mit ADV-Behandlung konnte ein positiver HBV-RNA-Nachweis im Serum durchgeführt werden (siehe **Tab 15**, rechte Spalte).

Eine Ursache der geringeren Sensitivität des Nachweises von HBV-RNA mit der HPoRACE-PCR ist die Verlängerung der DNA-Fragmente und die Veränderungen der PCR-Reaktionsbedingungen mit Maximierung der Extensions-Zeit auf 180sec. Die PCR-Amplifikation längerer DNA-Fragmente ist eine schwierige und von vielen Parametern abhängige Technik. Eine Steigerung der Nachweisquote ließe sich durch weitere Feinoptimierung erreichen, die in folgenden Studien vorgenommen werden müssen.



**Abb. 22: Detektion langer HBV-RNA-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese mit der neu etablierten HPO-RACE-PCR** Spur 1+20: DNA-Längenstandard Lambda-pUC Mix Marker 4, Spur 2: Negativprobe, Spur 3: HBV-RNA Positivprobe (Probe 6508), Spur 4-19: HBV-RNA-Serumproben von Patienten mit CHB

<i>HBV-RNA-Nachweis</i>	<i>HBV-RACE-PCR</i>	<i>HPoRACE-PCR</i>
<i>LAM-Therapie:</i>		
Positiv	18/37 (49%)	15/33 (45%)
Negativ	19/37 (51%)	18/33 (55%)
<i>ADV-Therapie:</i>		
Positiv	14/28 (50%)	10/28 (36%)
Negativ	14/28 (50%)	18/28 (64%)

**Tab 15 Tabellarische Übersicht des HBV-RNA-Nachweis im Serum von Patienten mit CHB.** Eine Untergruppierung erfolgte nach Therapiestrategie (LAM und ADV). Die linke Spalte zeigt die Untersuchungsergebnisse der in der Literatur beschriebenen HBV-RACE-PCR nach Sallie, die rechte Spalte zeigt die Ergebnisse der neu etablierten HPoRACE-PCR.

### 3.2.4. Korrelation der Hepatitis-B-Virus-RNA mit virologischen und biochemischen Resistenzparametern

Die HBV-RNA ist ein wichtiger Bestandteil des Replikationszyklus der HBV-Infektion und lässt sich unter bestimmten Bedingungen auch im Serum von Patienten mit einer CHB nachweisen (siehe Kap.2.2.4). Als möglicher Mechanismus des Nachweises viraler RNA im Serum wird die Freisetzung von HBV-RNAs aus den vom Immunsystem zerstörten Leberzellen diskutiert (Black 1980). Zudem wird unter einer Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga wie LAM, die reverse Transkription und somit die Synthese viraler DNA gehemmt. Die

Produktion der HBV-RNA hingegen wird nicht beeinflusst. Dadurch können Viruspartikel mit RNA-Segmenten dominant werden (siehe Kap. 1.7.2, Abb. 12) (Zhang, et al. 2003).

Um zu überprüfen, ob der Nachweis von HBV-RNA im Serum mit den virologischen- (HBV-DNA-Last) oder biochemischen Resistenzparametern (GPT) korreliert, wurde eine statistische Analyse mittels eines exakten Fisher-Tests durchgeführt.

Für die HBV-DNA-Viruslast zeigte sich bei der HBV-RACE-PCR nach Sallie (siehe Kap.2.2.4) eine schwach statistische Korrelation mit dem Nachweis von HBV-RNA im Serum ( $r = 0.25$ ,  $p = 0.055$ ). Für den Nachweis der HBV-RNA mit der neu etablierten HPoRACE-PCR (siehe Kap.3.2) zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zur Höhe der HBV-DNA-Viruslast ( $r = 0.29$ ,  $p = 0.027$ , siehe Kap. 3.2.3). Bei beiden angewendeten PCR-Methoden korrelierte die Enzymaktivität der GPT nicht mit dem Nachweis von HBV-RNA im Serum ( $r = -0.05$ ,  $p = 0.701$ ).

### **3.3. Mutationsanalyse im YMDD-Motiv der Hepatitis-B-Virus-Polymerase von Replikationsintermediaten unter Lamivudin-Therapie**

#### **3.3.1. Molekulargenetische Analyse des YMDD-Motivs auf Ebene der Hepatitis-B-Virus-DNA**

Zu den ersten Medikamenten aus der Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) gehörte Lamivudin (LAM; Zeffix®, Epivir®). LAM zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit in der klinischen Anwendung aus, zeigt jedoch eine schwache antivirale Wirkung und eine rasche Resistenzentwicklung. Bei 14-32% der chronisch HBV-infizierten Patienten lässt sich eine Resistenzmutation innerhalb des ersten Jahres der Behandlung nachweisen, bei 38% nach zweijähriger Behandlung und bei 53-76% nach dreijähriger Behandlung (Lai, Dienstag, et al. 2003). Die wichtigsten LAM-Resistenzmutationen rtM204V/I befinden sich im katalytischen Zentrum der

HBV-Polymerase in der Reversen-Transkriptase-Domäne im YMDD-Motiv (siehe Kap.1.6, **Abb. 10**). YMDD ist die Abkürzung für die Aminosäuresequenz Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat. Bei der Selektion der YMDD-Resistenzmutationen findet ein Austausch von Methionin mit entweder Valin oder Isoleucin im Kodon 204 statt (Allen, et al. 1998).

Bei dieser Arbeit wurde bei 24 Serumproben untersucht, ob sich antivirale Resistenzmutationen bei Therapie mit LAM nur durch Selektion über die virale Polymerase auf der HBV-DNA manifestieren, oder ob sie auch auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate nachweisbar sind. Dazu wurde zunächst eine genotypische Analyse der HBV-DNA durchgeführt und dann im nächsten Schritt die HBV-RNA-Replikationsintermediate mittels HPO-RACE-PCR und Sequenzanalyse untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Nach HBV-DNA-Extraktion, HBV-DNA-PCR und direkter DNA-Sequenzierung, erfolgte ein Sequenzabgleich auf Mutationen in der HBV-RT-Domäne mit HBV-Referenzsequenzen (siehe Kap 2.2.1). Die identifizierten Mutationen befanden sich meist in den hochkonservierten Domänen der Reversen Transkriptase (Domäne A-F, siehe Kap.1.6, **Abb. 11**). Im katalytischen Zentrum (YMDD-Motiv, C-Domäne) ließen sich die LAM-Resistenzmutation *rtM204I/V/S* (Allen, et al. 1998) nachweisen. In der B-Domäne konnte die Mutation *rtL180M* (Bock, Tillmann, et al. 2002) gezeigt werden und in einer Probe ließ sich in der E-Domäne die potentielle LAM-Resistenzmutation *rtC256S* (Lai, Dienstag, et al. 2003) diagnostizieren (siehe **Tab 16**).

<i>Proben Nr.</i>	<i>Genotyp</i>	<i>rtL180M</i>	<i>rtM204V/I</i>	<i>rtC256S</i>
508	D	--	I	--
608	D	--	--	--
1908	C	--	--	--
2108	D	--	--	--
2608	D	--	--	--
2808	C	--	--	S
6508	D	--	--	--
7108	D	--	I	--
1007	A	--	I	--
3007	D	--	I	--

5507	A	M	V	--
5607	A	--	I	--
10007	A	M	V	--
13007	D	--	I	--
16007	D	M	V	--
17407	A	M	V	--
19607	D	--	I	--
20307	C	M	V	--
21007	C/D	M	V	--
22007	C	--	I	--
22207	A	--	I	--
27607	C	M	V	--
29207	D	--	--	--
30907	A	--	I	--

**Tab 16: Tabellarische Auflistung der 24 sequenzierten Proben mit HBV-Genotyp und den Ergebnissen der Resistenzmutationsanalyse.** Neben der im YMDD-Motiv der RT-Region der viralen Polymerase vorliegenden Mutation rtM204V/I wurden die Proben auch auf weitere bekannte LAM-Resistenzmutationen wie rtL180M und rtC256S untersucht.

### 3.3.2. Molekulargenetische Analyse des YMDD-Motivs auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate

#### 3.3.2.1. Überblick

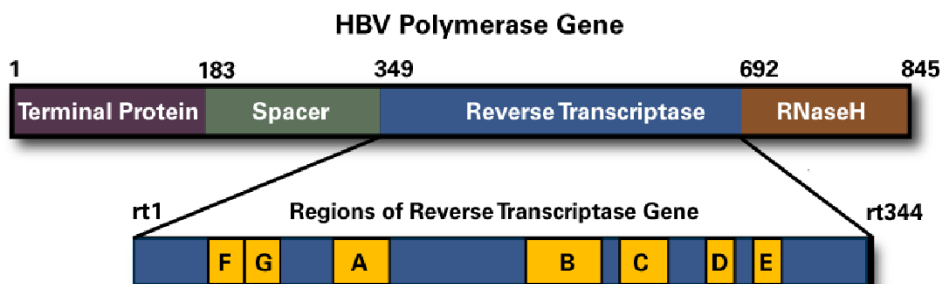
Für die Mutationsanalyse des YMDD-Motivs der HBV-RNA-Replikationsintermediate wurde die im Rahmen dieser Arbeit neu etablierte HPoRACE-PCR eingesetzt.

Nach Extraktion der HBV-RNA aus dem Serum und HPoRACE-PCR, erfolgte die direkte DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte nach Sanger (siehe Kap.3.2). Zum Editieren der Sequenzen wurde das Programm CEQ-Analyzer von Harlow Scientific verwendet. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen durch Abgleich erfolgte mit dem Programm BioEdit (siehe Kap.2.2.5). Die Reverse-Transkriptase-Region der HBV-Polymerase wurde von Aminosäure 1 bis 344 für die Mutationsanalyse auf Abweichungen

im Vergleich zum Referenzstamm für Genotyp A und D (siehe Kap. 1.4.2, **Tab 10**) molekulargenetisch analysiert.

Bei 13/24 (54%) Proben gelang eine Darstellung des YMDD-Motivs (siehe **Abb. 23**), bei 8/24 (33%) Proben konnte keine Sequenz dargestellt werden und bei 3/24 (13%) Proben war die Qualität der Sequenz nicht ausreichend für ein Abgleich mit den Referenzsequenzen. Ursächlich hierfür erscheint am ehesten die Länge des in der direkten Sequenzierung eingesetzten PCR-Produktes von ca. 2300bp. Trotz Optimierung der Reaktionsabläufe während der Sequenzierung zeigte die klassische direkte Sequenzierung eine Limitation der Nachweisgenauigkeit.

**A:**



**B:**



**Abb. 23: Molekulargenetische Analyse der HBV-Reversen-Transkriptase-Region. A:** Schematische Abbildung des HBV-Polymerasegens, **B:** BioEdit-Sequenzabgleich mit dem rot umrahmten Bereich des YMDD-Motivs mit potentieller LAM-Resistenz rtM204V/I im YMDD-Motiv. **Spalte links:** HBV-Referenzstämme (Gendatenbank NCBI NHI [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und nummerierte patienten-spezifische HBV-RNA-Proben. Die Nummerierung der reversen Transkriptase des HBV-Genoms (hier auszugsweise Position 165-221) entspricht dem Konsens des HEP DART International Comitee (Stuyver, et al. 2001). **Zeile 1:** Referenzsequenz HBV-Wildtyp-PCR-Produkt. **Zeile 2+3:** Referenzsequenz des Genotyps A (Z72478 Valenzuela) und Referenzsequenz des Genotyps D (V01460 Galibert). **Zeile 4-13:** Sequenzabgleich der patienten-spezifischen HBV-RNA-Proben.



### 3.3.2.2. Sequenzanalyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate

Für den Nachweis der mutationsrelevanten Sequenzbereiche der HBV-RT-Region (YMDD-Motiv) erfolgte zunächst eine molekulargenetische Analyse von sechs Proben, bei denen anhand von Sequenzierungen auf HBV-DNA-Ebene eine Mutation im YMDD-Motiv bereits ausgeschlossen wurde (siehe Kap.3.1). Bei den 6 HBV-Wildtyp-Proben waren die Ergebnisse der HBV-DNA-Sequenzierung und der Sequenzierung der HBV-RNA-Replikationsintermediate identisch. Nach Abgleich mit den Referenzstämmen konnte bei allen sechs Proben das YMDD-Motiv mit der Wildtyp-Variante (WT) dargestellt werden (siehe **Tab 17**).

<i>Proben Nr.</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Viruslast IU/l</i>	<i>HBe-Ag</i>	<i>GPT IU/l</i>	<i>Mutationsanalyse HBV-DNA</i>	<i>Mutationsanalyse HBV-RNA-Replikationsinterm.</i>
608	D	38000	Neg.	29	YMDD	YMDD
1908	C	-	-	-	YMDD	YMDD
2108	D	1290000	Pos.	20	YMDD	YMDD
2608	D	43700	Pos.	23	YMDD	YMDD
6508	D	1950000	Pos.	28	YMDD	YMDD
29207	D	355000	Pos.	23	YMDD	YMDD

**Tab 17: Tabellarische Auflistung der Proben ohne Lamivudin-Resistenzmutation.** Neben klinischen Parametern wie HBV-DNA-Viruslast, HBeAg-Status und GPT sind die Ergebnisse der Genotyp-Untersuchung und der Resistenzmutationsanalyse im YMDD-Motiv auf HBV-DNA und auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate abgebildet.

Im nächsten Schritt wurden 7 Proben mit HBV-DNA-Resistenzmutationen untersucht. Aus den Einsendeunterlagen der entsprechenden Proben ging hervor, dass bei allen sieben Patienten zum Zeitpunkt der Resistenzbestimmung eine Monotherapie mit LAM seit mindestens einem Jahr durchgeführt wurde. Bei der genetischen Analyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate kam es zu folgenden Ergebnissen (siehe auch Tab 18): Bei 5 HBV-RNA-Proben zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen der auf HBV-DNA und auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediaten

identifizierten Mutation im YMDD-Motiv, bei 2 HBV-RNA-Proben konnte auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate ein von der HBV-DNA abweichendes Ergebnis der Mutationsanalyse festgestellt werden (siehe **Tab 18**).

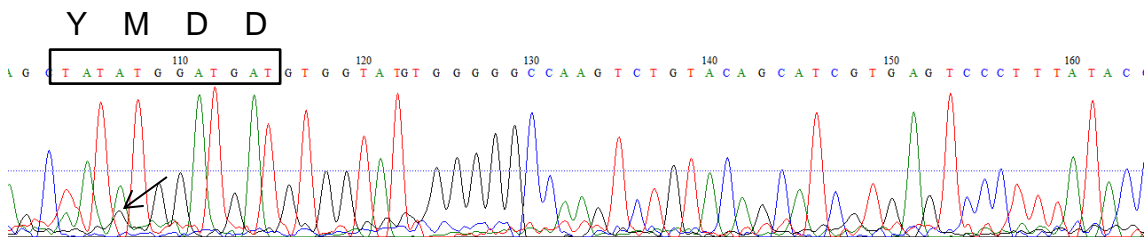
<i>Proben Nr.</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Viruslast IU/l</i>	<i>HBe-Ag</i>	<i>GPT IU/l</i>	<i>Mutationsanalyse HBV-DNA</i>	<i>Mutationsanalyse HBV-RNA-Replikationsinterm.</i>
1007	A	100000	Neg.	135	YIDD (rtM204I)	YIDD (rtM204I)
10007	A	52000000	Pos.	34	YVDD (rtM204V)	YMDD
13007	D	1350	Neg.	11	YIDD (rtM204I)	YIDD (rtM204I)
16007	D	39900	Neg.	62	YVDD (rtM204V)	YVDD (rtM204V)
17407	A	24000	Pos.	53	YVDD (rtM204V)	YVDD (rtM204V)
22007	A	1100000	Pos.	-	YIDD (rtM204I)	YMDD
27607	D	63000	Neg.	-	YVDD (rtM204V)	YVDD (rtM204V)

**Tab 18: Tabellarische Auflistung der Proben mit bekannten Lamivudin-Resistenzmutationen.** Neben klinischen Parametern wie HBV-DNA-Viruslast, HBeAg-Status und GPT sind die Ergebnisse der Genotyp-Untersuchung und der Resistenzmutationsanalyse im YMDD-Motiv auf HBV-DNA und auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate abgebildet. Rot eingerahmt sind die beiden Patientenproben 10007 und 22007, bei denen es abweichende Ergebnisse der genetischen Untersuchung und Vergleich zwischen HBV-DNA und HBV-RNA-Replikationsintermediate gab.

Bei Probe Nr. 10007, bei der die bekannte LAM-Resistenzmutation YVDD (rtM204V) im Bereich des Polymerasegens der HBV-DNA mit der Basensequenz *TAT GTG GAT GAT* festgestellt wurde (siehe Kap. 3.3.1), zeigte die genetische Analyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate in der Hauptpopulation die Sequenzabfolge *TAT ATG GAT GAT* (siehe **Abb. 24**).

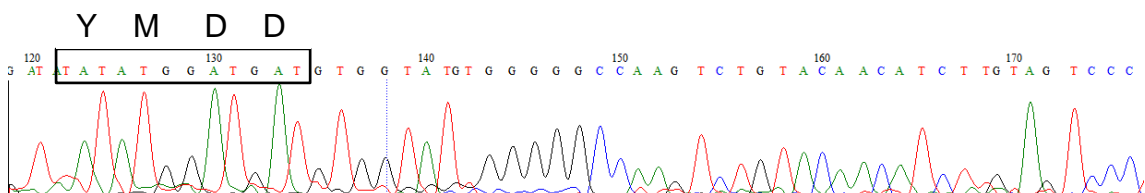
Dadurch entspricht die korrespondierende Aminosäuresequenz dem YMDD-Wildtyp (Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat). Im Hintergrund der Nukleotidsequenz konnte die Nukleotid-Triplet Kombination GTG (Aminosäure Valin) wieder dargestellt werden, was Anteilen einer YVDD-Resistenzmutation entspricht.

Mit der Sequenzierungsmethode nach Sanger können nur Subpopulationen mit einem Anteil von mehr als 20% des gesamten „Quasispezies-Pool“ abgebildet werden (Shaw, Bartholomeusz und Locarnini 2006). Demzufolge hat die untersuchte Probe 10007, einen mindestens 20%igen Anteil der YVDD-Subpopulation an der Gesamtpopulation.



**Abb. 24: Sequenzabschnitt der Probe 10007 im Bereich der HBV-Reversen-Transkriptase-Region** mit Detektion der für den Wild-typ codierenden Nukleotide ATG (Methionin) im YMDD-Motiv der reversen Transkriptase (Sequenzen schwarz eingerahmt). Das Elektropherogramm zeigt eine heterozygote Mutation mit Wildtyp (ATG) und der LAM-Resistenzmutation YVDD (ATG→GTG) (schwarzer Pfeil).

Bei der zweiten Probe mit Nr. 22007 wurde die bekannte LAM-Resistenzmutation YIDD (rtM204I, siehe Kap. 3.3.1) im Bereich des Polymerasegens der HBV-DNA mit Sequenzabfolge *TAT ATC GAT GAT* festgestellt. Die genetische Analyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate zeigte die Sequenzabfolge *TAT ATG GAT GAT* (siehe **Abb. 25**). Die Basensequenz der HBV-RNA-Replikationsintermediate entspricht der WT-Aminosäuresequenz Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat (YMDD). Auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate zeigte sich somit ein Verlust der LAM-Resistenzmutation.



**Abb. 25 Sequenzabschnitt der Probe 22007 im Bereich der HBV-Reversen-Transkriptase-Region.** Darstellung des HBV-Wildtyp Genoms im Bereich des YMDD-Motivs (schwarz eingerahmt).

## 4. Diskussion

Die Hepatitis-B-Virus(HBV)-Infektion stellt eine weltweite Herausforderung unserer Gesundheitssysteme dar. Schätzungsweise zwei Milliarden Menschen hatten mit HBV Kontakt, mehr als 240 Millionen davon sind chronisch infiziert. Jährlich sterben ca. 600.000 Menschen aufgrund akuter oder chronischer Folgeerscheinungen der Virusinfektion (WHO 2012). An medikamentötherapeutischen Optionen stehen derzeit Interferone (IFN, PEG-IFN $\alpha$ ) und Nukleos(t)id-Analoga zur Verfügung. Die IFN-Therapie ist aufgrund des breiten Nebenwirkungsspektrums von limitiertem therapeutischem Nutzen (Sun, et al. 2010). Der Einsatz von Nukleos(t)id-Analoga (Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Telbivudin und Tenofovir) ist durch die Selektion von Resistenzmutationen, die sich unterschiedlich schnell im Therapieverlauf entwickeln können, begrenzt. Demzufolge ist für den Erfolg der antiviralen Therapie eine zuverlässige Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung essentiell. Die Erforschung von Selektionsmechanismen viraler Resistenzmutationen unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein.

Normalerweise werden virale Resistenzmutationen auf HBV-DNA Molekülen, detektiert, die sich im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B (CHB) isolieren lassen. Bislang ist nicht beschrieben, ob diese Resistenzmutationen auch auf HBV-RNA-Replikationsintermediaten, wie z.B. virale RNAs (pgRNA) und HBV-cccDNA, nachzuweisen sind. Am Beispiel der Lamivudin(LAM)-Resistenzmutation im YMDD-Motiv der viralen Polymerase wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, in wie weit virale Resistenzmutationen gegenüber der Nukleosid-Analoga-Therapie von CHB-Patienten auch auf HBV-RNA-Replikationsintermediaten manifestiert sein können.

Die Ergebnisse aus diesem Forschungsprojekt werden Hinweise darauf geben, wie Resistenzmutationen im Replikationszyklus des HBV hinterlegt werden und die virale Resistenz gegenüber einer Therapieoption aufrecht erhalten. Aus diesen Erkenntnissen können sich damit neue Möglichkeiten der individualisierten Therapieanpassung ergeben.

## **4.1. Analyse des Hepatitis-B-Virus-Genotyps bei Patienten unter Nukleos(t)id-Analog-Therapie**

### **4.1.1. Geographische Prävalenz**

Das humane Hepatitis-B-Virus ist in acht Genotypen A-H aufgegliedert. Es zeigt sich dabei ein geographisches Verteilungsmuster (siehe Kap. 1.1.3, Abb. 1). Genotyp A lässt sich am häufigsten in Nord- und Mitteleuropa, sowie den USA nachweisen. Die HBV-Genotypen B und C treten gehäuft in Asien auf (Liu, Kao und Chen 2005). Genotyp D zeigt sich vor allem bei Patienten aus dem Mittelmeerraum, Mittleren Osten und Indien. In Zentral- und Osteuropa sind die HBV-Genotypen A und D zu ungefähr gleichen Anteilen vertreten (42% und 48%). In Deutschland kommt am häufigsten der HBV-Genotyp D vor (58%), gefolgt von Genotyp A (32%) (Deterding, et al. 2008).

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte (n=67) wurden hauptsächlich die HBV-Genotypen D und A nachgewiesen. Genotyp D hatte mit 49% die höchste Prävalenz, gefolgt von Genotyp A mit 28% (siehe 3.1.3, Abb. 17). Die Reihenfolge der Häufigkeit entspricht somit dem Ergebnis der großen Prävalenzstudie von Deterding et al von 2008. Der relativ große Anteil von Patienten mit Genotyp A könnte dadurch erklärt werden, dass überproportional viele Migranten aus Süd- und Osteuropa im Rahmen der CHB-Diagnostik in Deutschland untersucht wurden. Da die ethnische Herkunft der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte nicht eindeutig erfasst war, konnte eine weitere detaillierte Analyse diesbezüglich nicht durchgeführt werden.

### **4.1.2. Einfluss des Hepatitis-B-Virus-Genotyps auf Therapieansprechen und Resistenzentwicklung**

Die CHB ist hauptsächlich im asiatischen Raum endemisch, dementsprechend gibt es die meisten Daten zur Selektion und Auftreten von viralen Resistenzmutationen bei den dort prädominanten HBV-Genotypen B und C. Für die IFN-Therapie wurde in einer aktuellen Metaanalyse von 15 Studien gezeigt, dass Patienten mit dem HBV-Genotyp B besser auf die medikamentöse

Therapie ansprechen als Patienten mit dem HBV-Genotyp C (Kong, et al. 2014). Deutlich weniger Studien haben sich in den vergangenen Jahren mit dem Vergleich der HBV-Genotypen A und D beschäftigt. Für die IFN-Therapie gibt es eine Arbeit von Erhardt et al, die ein besseres Therapieansprechen bei Patienten mit einem HBV-Genotyp A im Vergleich zu Patienten mit HBV-Genotyp D sieht (Erhardt und Blondin 2005).

Auch beim Einsatz von Nukleos(t)id-Analoga wurden Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens in Abhängigkeit vom HBV-Genotyp festgestellt. Eine Studie von Zöllner et al. konnte nachweisen, dass Patienten mit dem HBV-Genotyp D im Vergleich zu Patienten mit dem HBV-Genotyp A ein deutlich besseres Ansprechen auf eine Therapie mit LAM, gemessen an der Abnahme der HBV-Konzentration innerhalb der ersten 12 Monate, hatten (Zöllner, et al. 2002). Die Inzidenz von LAM-Resistenzmutationen war bei den Patienten mit HBV-Genotyp D zudem signifikant niedriger als bei Patienten mit HBV-Genotyp A (Zöllner, et al. 2001).

Bei den HBV-Genotypen A und D ließen sich unterschiedliche Prävalenzen der einzelnen LAM-Resistenzmutationen im YMDD-Motiv der reversen Transkriptase (rtM204I/V) beobachten. Die Mutation rtM204I (YIDD) kam in der Gruppe der Patienten mit HBV-Genotyp D häufiger vor, wohingegen die Kombinationsmutation rtM204V/rtL180M (YVDD) sich signifikant häufiger bei Patienten mit HBV-Genotyp A zeigte (Zöllner, et al. 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar. Ältere Studien zeigen, dass es eine sogenannte Evolution der LAM-Resistenzmutation während der Therapie geben könnte. Zu Beginn der Therapie mit LAM kommt es zuerst zu einem Isoleucin-Austausch an Codon rt204 (rtM204I). Im weiteren Verlauf wird das Isoleucin durch Valin ersetzt (rtM204V) (Zöllner, Stoehr, et al. 2000), häufig parallel mit einer Methionin-Substitution bei Codon rt180 (rtL180M) (Gutfreund, et al. 2000). Diese Kombinationsmutation gilt als besonders stabil und zeigt auch Auswirkungen bezüglich Therapieresistenzen auf andere Nukleos(t)id-Analoga wie Entecavir und Telbivudin (Reijnders, et al. 2010) (Safadi, et al. 2011). Diesen Erkenntnissen zufolge sollte bei Patienten mit dem HBV-Genotyp A grundsätzlich eine Primärtherapie mit LAM überdacht werden. Aufgrund der

allgemein niedrigen Resistenzbarriere von LAM raten die aktuellen Leitlinien zur Therapie der chronischen Hepatitis-B Infektion -unabhängig vom HBV-Genotyp- von einer Primärtherapie mit LAM ab (M. Cornberg, et al. 2011).

Im Gegensatz zur LAM-Therapie findet sich bei der ADV-Therapie weder eine Beeinflussung der Selektion von Resistenzmutationen durch den HBV-Genotyp (Westland, et al. 2003), noch zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und HBV-Genotyp (Wiegand, Hasenclever und Tillmann 2008).

## **4.2. Antivirale Therapie der chronischen Hepatitis B mit Nukleos(t)id-Analoga**

### **4.2.1. Resistenzentwicklung unter Lamivudin- und Adefovir-Therapie**

Die Auswahl von Nukleos(t)id-Analoga sollte das Stadium der Lebererkrankung, die Höhe der HBV-DNA-Konzentration, sowie antivirale Vortherapien berücksichtigen. Bei einer Leberzirrhose oder einer Viruslast von  $>10^6$  IU/ml wird empfohlen, primär eine Substanz mit hoher genetischer Resistenzbarriere einzusetzen (S3-Leitlinie, Cornberg et al. 2011). Lamivudin (LAM) und Adefovir (ADV) sind reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) mit niedriger Resistenzbarriere. LAM verursacht bei fast 80% der Patienten eine Resistenzmutation innerhalb der ersten vier Jahre der Therapie (Lai, Dienstag, et al. 2003). Andererseits wurde gezeigt, dass bei schnellem Therapieansprechen (HBV-DNA  $< 200$  IU/ml nach 6 Monaten) und einer initial niedrigen HBV-DNA-Konzentration ( $< 10^6$  IU/ml) das Risiko für die Entstehung einer Resistenz im weiteren Verlauf gering ist (Yuen, et al. 2007). ADV ist sowohl gegenüber dem wild-type-HBV- als auch dem LAM-resistenten HBV-Stamm wirksam (S. Hadziyannis, et al. 2006). Patienten die mit LAM vorbehandelt wurden, zeigen jedoch ein erhöhtes Risiko eine ADV-Resistenzmutation zu entwickeln (Lee, et al. 2006). Bei Patienten ohne

Vorbehandlung mit einem Nukleos(t)id-Analogen entspricht die antivirale Effektivität von ADV der von LAM (P. Marcellin, T. Chang, et al. 2003).

In diesem Zusammenhang konnten von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit ADV-Monotherapie bei 20/30 (67%) Patienten eine Vortherapie mit LAM festgestellt werden. Die Therapieumstellung auf ADV erfolgte aufgrund einer virologischen und biochemischen Therapieresistenz gegenüber LAM. Im Rahmen der ADV-Resistenzbestimmung konnte eine LAM-spezifische Resistenzmutation im YMDD-Motiv (rtM204I/V) bei 8/20 (40%) der Patienten nachgewiesen werden (siehe Kap.3.1.2.). Dieses Ergebnis lag unter der zu erwartenden Mutationsrate nach langjähriger LAM-Therapie.

Vieles deutet darauf hin, dass nach Beendigung der LAM-Therapie eine „Repopulation“ des HBV-Wildtyps stattfindet und den LAM-resistenten HBV-Stamm wieder verdrängt. Von der Arbeitsgruppe um Seigneres et al. wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich komplexe virale Quasispezies hauptsächlich über einen längeren Zeitraum und unter unterschiedlichem antiviralem Selektionsdruck entwickeln und verändern können (Seigneres, et al. 2000). In einem „Case Report“ von Villeneuve et al. wurde dementsprechend ein Patient mit LAM-Resistenz beschrieben, bei dem unter Therapiepause ein Verlust dieser Resistenz beobachtet wurde und der unter ADV-Therapie danach eine neue, ADV-spezifische Resistenz (N236T) selektionierte (Villeneuve, et al. 2003).

#### **4.2.2. Vergleich der antiviralen Effektivität zwischen Lamivudin- und Adefovir-Therapie**

In der Literatur gibt es bezüglich der antiviralen Effektivität von ADV bei Patienten mit bekannter LAM-Resistenz widersprüchliche Daten. Eine Studie von Seo et al. untersuchte den Therapieerfolg anhand der HBV-DNA-Konzentration im Serum und verglich Patienten mit ADV und LAM-Vorbehandlung mit LAM bei Nukleos(t)id-naiven Patienten (Seo, et al. 2007). Es zeigte sich, dass die antivirale Effektivität von ADV bei Patienten mit LAM-



resistentem HBV-Stamm weniger potent war, als eine LAM-Therapie bei einem wild-typ HBV-Stamm.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte statistische Analyse der virologischen (HBV-DNA-Last) und biochemischen (GPT-Enzymaktivität) Resistenzparameter beider Therapiekohorten (LAM vs. ADV nach LAM), zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe Kap.3.1.4). Die Ergebnisse stimmen damit mit den Arbeiten von Perillo und Peters überein, die zeigten dass die ADV-Therapie bei therapienaiven, als auch bei LAM-resistenten Patienten gleiche antivirale Effekte erzielte (Perrillo, et al. 2000) (Peters, et al. 2004).

Beide Medikamente (LAM und ADV) haben für sich genommen eine relativ geringe antivirale Potenz und eine niedrige Resistenzbarriere. Um die antivirale Potenz der LAM- und ADV-Therapie im Allgemeinen zu steigern und synergistische Effekte einer Kombination aus Nukleosid- und Nukleotid-Analoga zu nutzen, wurden deshalb viele Patienten mit einer Kombinationstherapie aus LAM plus ADV therapiert. Damit konnte bei therapienaiven Patienten eine deutliche Reduktion von LAM-Resistenzen, eine niedrigere HBV-DNA-Konzentration im Serum und bessere Transaminasenwerte im Vergleich zur LAM-Monotherapie erreicht werden (Sung, et al. 2008). Lampertico et al. zeigte in einer Studie von 2007 zudem, dass sich das Risiko für eine LAM-Resistenz von 5% auf 0,8% verringert, wenn LAM nicht als Monotherapie- sondern in Kombination mit ADV verabreicht wird (Lampertico, et al. 2007). Im Umkehrschluss galt eine Kombinationstherapie aus LAM plus ADV auch günstig im Hinblick auf die Entwicklung von ADV-Resistenzen. So konnte in einer Arbeit von Delaney et al. 2007 keine der bekannten ADV-Resistenzen nach einer 5-jährigen Kombinationstherapie mit LAM plus ADV nachgewiesen werden (Delaney 2007).

In der aktuellen S3-Leitlinie zur Behandlung der Hepatitis-B-Virusinfektion hat die Kombinationstherapie mit LAM und ADV jedoch keinen relevanten Stellenwert mehr erhalten. Der Einsatz von ADV wird aufgrund der geringen antiviralen Potenz, der Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung im Langzeitverlauf und der ausgeprägten Nephrotoxizität von ADV grundsätzlich nicht mehr empfohlen (M. Cornberg, et al. 2011). Allerdings wird ADV aufgrund

guter Verfügbarkeit und geringem Preis in vielen Ländern, insbesondere in Asien und Afrika, weiterhin eingesetzt (Lo und Wong 2014).

### **4.3. Charakterisierung von HBV-RNA-Replikationsintermediaten im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B**

#### **4.3.1. Methodische Herausforderungen beim Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten**

Über Vorkommen und Verhalten von HBV-RNA-Replikationsintermediaten im Serum chronisch HBV-infizierter Patienten ist bis dato wenig bekannt. Die Existenz viraler RNA im Serum ist schwer nachweisbar, da die ubiquitär vorkommenden RNase-Enzyme theoretisch zum sofortigen Abbau des RNA-Moleküls führen (Blank und Decker 1981). Trotzdem lässt sich mit verschiedenen Methoden HBV-RNA im Serum nachweisen (Zhang, et al. 2003). Als möglicher Mechanismus wurde bereits 1980 die Freisetzung und Verpackung viraler RNA in Plasmamembranvesikel aus der vom Immunsystem zerstörten Leberzelle diskutiert (Black 1980). Einige Studien suggerieren, dass replikative Zwischenprodukte in mononukleären Zellen (PBMC) im Blutserum nachweisbar sind (Köck, Theilmann, et al. 1996). Bei Patienten mit hoher Viruslast wurde in Einzelfällen cccDNA und virale HBV-RNA in diesen Zellen nachgewiesen (Stoll-Becker, et al. 1997). Da die Konzentration von HBV-DNA und pgRNA in den mononukleären Zellen von der antiviralen Therapie relativ unbeeinflusst bleibt (Lu, et al. 2009), könnten diese Zellen als extrahepatisches Reservoir dienen und verantwortlich für die Viruspersistenz und Reaktivierung sein (Brind, et al. 1997).

Die Etablierung der viralen HBV-RNA als serologischer Marker bietet deshalb neue Möglichkeiten der Diagnose und Differenzierung von apparenten und inapparenten Stadien der chronischen HBV-Infektion. Diese Problematik betrifft zum Beispiel die Transplantationsmedizin. Bei der okkulten Hepatitis können die bisher etablierten serologischen Marker eine HBV-Infektion beim Spender

nicht sicher detektieren. Nach Transplantation in den gesunden Organismus besteht die Gefahr einer Reaktivierung mit akuter Hepatitis und Übergang in eine chronische Verlaufsform (Cacciola, et al. 1999).

Die selektive Darstellung von HBV-RNA im Serum kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Eine übliche Vorgehensweise ist die gemeinsame Extraktion von HBV-DNA und HBV-RNA, gefolgt von einem enzymatischen Verdau der HBV-DNA. Da ein vollständiger Verdau der HBV-DNA schwierig ist, lassen sich gerade kleine Mengen an HBV-RNA mit dieser Methode nicht sicher darstellen. Die initialen Versuche im Rahmen dieser Arbeit, eine sichere und qualitativ hochwertige HBV-RNA Extraktion zu bewerkstelligen, waren deswegen wenig erfolgversprechend. Trotz hochpotenter und hochspezifischer DNase-Enzyme gelang keine vollständige Elimination der HBV-DNA im DNA/RNA-Extraktionsgemisch. Zusätzlich verursachte die zur Enzymaktivierung notwendige Arbeitstemperatur der DNase (37°C) hitzebedingte Schäden am HBV-RNA-Template und führte folgend zum Mislingen der reversen Transkription (siehe Kap. 2.2.3.1). In weiterführenden Untersuchungen wurde schließlich eine Methode etabliert, bei der mit Hilfe eines „Lock-Docking-Primers“ und HBV-spezifischen Amplifikations-Primer ein selektiver Nachweis der HBV-RNA gelang (Sallie 1994) (siehe Kap. 2.2.4).

Zur Bearbeitung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob Resistenzmutationen im YMDD-Motiv der reversen Transkriptase, die auf dem HBV-DNA-Molekül lokalisiert sind, auch bei HBV-RNA-Replikationsintermediaten zu finden sind, wurden neue Primersysteme und Modifikation der Reaktionsabläufe implementiert und eine hochsensitive und hochspezifische HPO-RACE-PCR etabliert (siehe Kap. 3.2).

Im direkten Vergleich der PCR-Produkte der HBV-RACE-PCR-Methode von Sallie et al. und der neu etablierten HPO-RACE-PCR zeigte sich aber, dass die deutlich längeren PCR-Produkte der HPO-RACE-PCR weniger intensive Banden aufwiesen, als die kürzeren PCR-Produkte der HBV-RACE-PCR (siehe Kap.3.2.2, **Abb. 20**). Zudem gelang der HBV-RNA-Nachweis mit der HPO-RACE-PCR weniger häufig, als mit der HBV-RACE-PCR (45% vs. 49% in

der LAM-Gruppe und 36% vs. 50% in der ADV-Gruppe, siehe Kap.3.2.3, **Abb. 22**). Die Verlängerung des PCR-Produktes mittels des neuen Primersystems und die Modifikationen der Reaktionsabläufe zeigten somit eine Abnahme der Nachweisqualität im Vergleich zur HBV-RACE-PCR. Durch intensive Optimierung der Nachweismethode, wäre es jedoch möglich die Nachweisqualität deutlich zu verbessern.

#### **4.3.2. Auswirkung der Virusaktivität unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie auf den Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediate**

Nukleos(t)id-Analoga verhindern die HBV-Replikation in den Hepatozyten und führen zu einer Reduktion der HBV-DNA- Konzentration im Serum bis teilweise unterhalb der Nachweisgrenze (Lai, Shouval, et al. 2006). Durch die starke Hemmung der viralen DNA-Synthese bei der reversen Transkription, wird die Konzentration an zytoplasmatischen Viruskapsiden signifikant gesenkt. Dadurch stehen weniger Kapside zur Verfügung, die nach Einschleusung in den Zellkern den Pool der intrahepatischen HBV-cccDNA über einen intrazellulären Infektionsweg aufrechterhalten können (Delmas, et al. 2002). Für die Langzeittherapie mit ADV konnte gezeigt werden, dass die intrahepatische HBV-cccDNA-Konzentration nach der HBeAg-Serokonversion und nach dem Verlust von HBsAg deutlich abnahm, jedoch nicht komplett verschwand (Werle-Lapostolle, et al. 2004). Nach Therapieende oder bei Auftreten von Resistenzen gegen die antivirale Therapie, geht von der intrahepatisch verbleibenden HBV-cccDNA die Reaktivierung der Infektion mit sprunghaftem Wiederanstieg der HBV-DNA-Konzentration im Serum aus (Newbold, et al. 1995).

Die quantitative Bestimmung der intrahepatischen HBV-DNA und HBV-cccDNA kann in ca. 75% der Fälle eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung des Hepatitis-B-Virus ermöglichen und somit zur Bestimmung des Behandlungsendpunktes mit herangezogen werden (Sung, et al. 2005). Dafür bedarf es jedoch im Regelfall einer invasiven Diagnostik mit Durchführung einer Leberbiopsie. Serummarker, die mit der Konzentration der

intrahepatischen HBV-cccDNA korrelieren, haben somit einen hohen klinischen Nutzen. Einzelne Arbeiten konnten eine Korrelation zwischen HBV-RNA im Serum und der hepatischen HBV-cccDNA-Konzentration bereits aufzeigen (Rokuhara, et al. 2006).

Hatakeyama et al. konnten in einer Studie von 2007 zeigen, dass im Rahmen einer Resistenzentwicklung nicht nur die HBV-DNA-, sondern auch die HBV-RNA-Konzentration im Serum steigt (Hatakeyama 2007). So war die Konzentration der HBV-RNA im Serum bei den Patienten signifikant höher, die innerhalb eines Jahres nach Therapiebeginn mit LAM eine Resistenzmutation entwickelt hatten. Bei therapie-naiven Patienten hingegen lag der Anteil HBV-RNA enthaltender Viruskapside bei lediglich 1% (Zhang, et al. 2003). Bei den LAM-behandelten Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, lag die Nachweisbarkeit von HBV-RNA bei 15/33 (45%) der untersuchten Serumproben. Bei den ADV-behandelten Patienten lag die Nachweisquote bei 10/28 (36%) (siehe Kap. 2.2.4, **Tab 15**). Die mittlere Behandlungsdauer der untersuchten Proben lag mit 2,8 Jahren (SD+/-1,8 Jahre) deutlich über dem von Hatakeyama et al. beobachteten Zeitraum. Trotzdem lässt sich aufgrund der zeitlichen Nähe zum virologischen und biochemischen „Breakthrough“ der Infektion, der Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten im Serum als früher Hinweis auf eine Replikationsaktivität des Hepatitis B-Virus verstehen.

#### **4.3.3. Korrelation der HBV-DNA-Konzentration mit dem Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten**

Eine aktuelle Arbeit von Tsuge et al. zeigte, dass die Höhe der HBV-DNA- und der HBV-RNA-Konzentration signifikant mit der Reaktivierung der CHB nach Absetzen der Nukleos(t)id-Therapie assoziiert ist (Tsuge, et al. 2013). In einer Studie von Su et al wurde zudem eine Korrelation zwischen dem Nachweis der „fulllength“-HBV-RNA und der Höhe der HBV-DNA-Konzentration aufgestellt (Su, et al. 2001). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch für die in dieser Arbeit untersuchten Serumproben ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der HBV-DNA-Konzentration und dem positiven Nachweis

von HBV-RNA im Serum hergestellt werden ( $r = 0.29$ ,  $p = 0.027$ , siehe Kap. 3.2.3).

Die Limitation dieses Ergebnisses ergibt sich aus der relativ geringen Anzahl an untersuchten Serumproben ( $n=61$ ). Um eine bessere Aussagekraft zu erzielen, wäre es im Rahmen weiterführender Studien erstrebenswert, eine größere Anzahl von Patientenproben (Seren) in unterschiedlichen HBV-Endemiegebieten zu erfassen und detaillierter zu untersuchen.

#### **4.3.4. Mutationsanalyse im YMDD-Motiv der HBV-RNA-Replikationsintermediate und Bedeutung für die Nukleosid-Therapie mit Lamivudin**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde auf den Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten mit der HPO-RACE-PCR eingegangen und Parameter wie die HBV-DNA-Konzentration oder die Therapie mit LAM und ADV vorgestellt, die den Nachweis explizit beeinflussen. Sowohl LAM als auch ADV zeichnen sich im Vergleich zu neueren Substanzen wie Tenofovir und Entecavir durch eine niedrigere Resistenzbarriere aus und werden deshalb nicht mehr zur primären Therapie der CHB eingesetzt. Eine Therapie mit ADV wird aufgrund beträchtlicher Nephrotoxizität nach den aktuellsten Leitlinien nicht mehr empfohlen (M. Cornberg, et al. 2011). LAM hingegen findet noch regelmäßigen Einsatz im Rahmen von Kombinationstherapien und wird aufgrund guter Verfügbarkeit und ökonomischer Aspekte in asiatischen und afrikanischen Ländern häufig eingesetzt. Die Charakterisierung von HBV-Isolaten bei Patienten unter LAM-Therapie und Mutationsanalyse von HBV-RNA-Replikationsintermediaten hat somit trotz des schwindenden klinischen Einsatzes in Deutschland weiterhin Relevanz.

Bei dieser Arbeit wurden bei 13 Serumproben von Patienten mit einer LAM-Therapie eine Sequenzierung und molekulargenetische Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich bei 6 HBV-Wildtyp-Isolaten auch bei den HBV-RNA-Replikationsintermediaten der HBV-Wildtyp. Bei 7 Serumproben mit LAM-Resistenz (Proben-Nr. 1007, 10007, 13007, 16007, 17407, 22007 und 27607)

konnte bei 5/7 (71%) die LAM-Resistenzmutation der HBV-DNA-Moleküle auch bei den HBV-RNA-Replikationsintermediaten identifiziert werden, bei 2/7 (29%) Proben zeigten sich interessanterweise im Gegensatz zu den Resistenzmutationen des HBV-DNA-Moleküls, bei den HBV-RNA-Replikationsintermediaten der HBV-WT als dominante Population. Bei einer dieser Proben (Proben-Nr. 10007) wurde in der Sequenzierung und Mutationsanalyse die für den WT codierende Nukleotide ATG (Methionin) im YMDD-Motiv detektiert. Zusätzlich ließen sich im Hintergrund der Sequenz Anteile des Nukleotids G an Position 1 (GTG) detektieren, sodass eine Subpopulation der LAM-Resistenzmutation (YVDD-Variante) nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 3.3.2.2, Abb. 24).

Ein vergleichbares Phänomen wurde von der Arbeitsgruppe Mello et al. bei der Untersuchung des HBV-DNA-Moleküls beschrieben (Mello, et al. 2012). Mit direkter Sequenzierung und Pyrosequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass im Serum von Patienten mit einer CHB unterschiedliche HB-Virusvarianten gleichzeitig zirkulieren. Abhängig vom Selektionsdruck zeigte sich eine Dominanz der jeweiligen Variante. Insbesondere bei Patienten mit Nukleosid-Analoga-Vorbehandlung wie LAM, konnte ein Gemisch aus HBV-Wildtyp- und YMDD-Mutanten im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Mit der Pyrosequenzierung gelang im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger eine noch genauere Stratifizierung der HB-Virusvarianten. So konnte bei 9/19 Proben mit der HBV-WT-Hauptpopulation eine YMDD-Mutation in der Subpopulation und bei 11/25 Proben mit einer YMDD-Mutation in der Hauptpopulation, zusätzlich Anteile einer WT-Subpopulation gezeigt werden.

Mit der Sequenzierungsmethode nach Sanger können nur Subpopulationen mit einem Anteil von mehr als 20% des gesamten „Quasispezies-Pool“ abgebildet werden (Shaw, Bartholomeusz und Locarnini 2006). Demzufolge hat die in dieser Arbeit untersuchte Probe 10007, einen mindestens 20%igen Anteil der YVDD-Subpopulation. Mit dem Pyrosequenzierungsverfahren ließen sich in der Arbeit von Mello noch exakter Subgruppen mit bis zu 5% Anteil an der Gesamtpopulation detektieren, sodass diese Methode dem direkten Sequenzierungsverfahren nach Sanger in der Nachweisempfindlichkeit deutlich

überlegen ist. Da andere Verfahren wie die RFLP-Analyse und der „line-probe assay“ teuer und aufwendig sind, wäre die Anwendung der Pyrosequenzierung auf die HBV-RNA-Replikationsintermediate eine Möglichkeit, Subgruppen zu erfassen, die unter einem 20% Anteil an der Gesamtpopulation liegen. Alternativ könnte in Folgeexperimenten die Sequenzqualität der direkten Sequenzierung nach Sanger weiter optimiert werden und die Methode an einer größeren Anzahl von Serumproben angewandt werden.

#### **4.4. Schlussfolgerung**

Die Detektion von HBV-RNA-Replikationsintermediaten im Serum von Patienten mit einer CHB ist mit hoher Spezifität und Sensitivität mit der HPO-RACE-PCR möglich. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten, die HBV-RNA als serologischen Marker zur Entscheidung und Kontrolle der antiviralen Therapie heranzuziehen.

Exemplarisch wurde bei Patienten unter Lamivudin-Therapie eine Mutationsanalyse und Vergleich der HBV-RNA-Replikationsintermediate und des HBV-DNA-Moleküls durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Resistenzmutationen nicht nur auf dem HBV-DNA-Molekül, sondern auch bei den HBV-RNA-Replikationsintermediaten hinterlegt sind. Bei einer HBV-RNA-Probe konnte ein Verlust der YMDD-Mutation und bei einer Probe eine Koexistenz verschiedener HBV-Stämme festgestellt werden. Mithilfe des Nachweises koexistierender HBV-Stämme ist es möglich, bereits vor dem virologischen und biochemischen Durchbruch der HBV-Infektion die antivirale Therapie anzupassen. Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen eröffnen damit neue Möglichkeiten der individualisierten Therapieanpassung.



## 5. Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) zählt zu den häufigsten Virusinfektionen weltweit. Ca. zwei Milliarden Menschen hatten mit dem HBV Kontakt, mehr als 240 Millionen davon sind chronisch infiziert. Jährlich sterben ca. 600.000 Menschen aufgrund akuter oder chronischer Folgeerscheinungen der Infektion, wie z.B. durch das hepatozelluläre Karzinom. Die medikamentöse Therapie mit Interferonen und Nukleos(t)id-Analoga ist aufgrund von Nebenwirkungen und der Selektion von Resistenzmutationen limitiert. Da die Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga einen hohen Stellenwert einnimmt, ist das Verständnis der komplexen Mechanismen einer Resistenzentwicklung für die Optimierung der Therapie und Entwicklung neuer antiviraler Substanzen essentiell.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde dementsprechend in molekulargenetischen Analysen untersucht, ob die durch den Selektionsdruck der Nukleosid-Analoga-Therapie mit Lamivudin entstandenen Resistenzmutationen der HBV-Polymerase (Reverse-Transkriptase-Domäne), nur auf den HBV-DNA-Molekülen nachweisbar sind, oder ob sie sich z.B. in späten Stadien der HBV-Infektion und unter Fortgang der Therapie, auch auf Ebene der HBV-RNA-Replikationsintermediate manifestieren können.

Für die Untersuchung der Resistenzmutationen wurde HBV-DNA und HBV-RNA aus Seren von 67 Patienten analysiert, bei denen sich anhand virologischer und biochemischer Parameter eine Reaktivierung der CHB feststellen ließ. Für die spezifische Isolation und Amplifikation von HBV-RNA-Molekülen wurde mit der HPoRACE-PCR eine neue Methode etabliert. Die Mutationsanalyse erfolgte durch Sequenzierung der mittels HPoRACE-PCR amplifizierten Domäne der reversen Transkriptase des HBV-Genoms und anschließender Genotypisierung. Die statistische Analyse wurde mit dem „SPSS“-Statistikprogramm durchgeführt.

Die molekular-epidemiologischen Untersuchungen ergaben eine Prädominanz des HBV-Genotyp D (49%), gefolgt von HBV-Genotyp A (28%) im analysierten Patientenkollektiv. Dies entspricht der Genotypverteilung neuerer Studien zur Genotypprävalenz in Deutschland. Zwischen der Patientenkohorte mit

Lamivudin (n=37) und Adefovir-Behandlung (n=30) gab es bezüglich der virologischen und biochemischen Resistenzparameter keinen signifikanten Unterschied. Dieses Ergebnis erklärt, dass Adefovir bei fehlender Therapieüberlegenheit und ausgeprägter Nephrotoxizität, nach den aktuellsten HBV-Leitlinien nicht mehr als Therapieoption aufgeführt wird.

Nach der Charakterisierung des Patientenkollektivs wurde im nächsten Schritt mittels genotypischer Mutationsanalyse der HBV-DNA-Genome aus dem Serum der CHB-Patienten unter antiviraler Therapie das Resistenzmutationsmuster untersucht. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass sich Resistenzmutationen gegenüber der antiviralen Therapie unter Selektionsdruck und im zeitlichen Verlauf der Therapie entwickeln und verändern können.

Da der Nachweis von HBV-RNA-Molekülen im Serum von CHB-Patienten äußerst schwierig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue hochsensitive und hochspezifische HPoRACE-PCR entwickelt. In den folgenden Untersuchungen mittels HPoRACE-PCR und Mutationsanalyse an den HBV-RNA-Replikationsintermediaten zeigte sich eine Korrelation zwischen der HBV-DNA-Last und dem Nachweis von HBV-RNA-Replikationsintermediaten im Serum ( $p=0.027$ ). Bei der genotypischen Mutationsanalyse der HBV-RNA-Replikationsintermediate konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass bei bekannter YMDD-Mutation in den HBV-DNA-Molekülen korrelierend auf den HBV-RNA-Replikationsintermediaten entweder Mischpopulationen vorlagen (z.B. M204V/M204wt) oder die Mutation durch den HBV-Wildtyp ersetzt wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen zum ersten Mal, dass antivirale Resistenzmutationen der HBV-Polymerase und deren Variabilität nicht nur im zeitlichen Verlauf der Therapie beobachtet werden können, sondern auch auf HBV-Replikationsintermediaten, wie auf der HBV-RNA und möglicherweise auch auf der HBV-cccDNA, hinterlegt werden. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten der Therapie-Entscheidung und Kontrolle. Weiterführende klinische und molekulargenetische Untersuchungen der Resistenzentwicklung sind zudem notwendig, um neue Erkenntnisse für eine individualisierte Therapie zu gewinnen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Akhter, S., M.Q. Talukder, N. Bhuiyan, T.A. Chowdhury, M.N. Islam, und S. Begum. „Hepatitis B virus infection in pregnant mothers and its transmission to infants.“ *Indian J Pediatr*, 1992: 59(4):411-5.
- Allen, MI, M Deslauriers, CW Andrews, und et al. „Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine.“ *Hepatology*, 1998: 27:1670-7.
- Angus, P, et al. „Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase.“ *Gastroenterology*, 2003: 125:292-297.
- Angus, P. W., et al. „Detection and use of antiviral resistance mutations.“ *WIPO Patent Application PCT/AU2007/000785*, 2007.
- Bartenschlager, R., und H. Schaller. „The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription.“ *EMBO J.*, 1988: 7:4185-4192.
- Beasley, R.P., L.Y. Hwang, C.C. Lin, und C.S. Chien. „Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan.“ *Lancet*, 1981: 2:1129-1133.
- Berg, T, et al. „Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) versus emtricitabine plus TDF for treatment of chronic Hepatitis B (CHB) in subjects with persistent viral replication receiving adefovir dipivoxil (ADV).“ *Journal of Hepatology*, 2008: 48(Suppl.2):S34 (abstract 76).
- Black, P. H. „Shedding from normal and cancer cell surfaces.“ *N. Engl. J. Med.*, 1980: 303:1415-1416.
- Blank, A, und CA Decker. „Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels.“ *Biochemistry*, 1981: 20:2261-2267.
- Blumberg, B.S., B.J. Gerstley, D.A. Hungerford, W.T. London, und A.I. Sutnick. „A serum antigen (Australia antigen) in Down' syndrome, leukaemia and hepatitis.“ *Ann Intern Med*, 1967: 66(5): 924-31.
- Blumberg, B.S., H.J. Alter, und S. Visnich. „A "new" antigen in leukemia sera.“ *JAMA*, 1965: 191, 541.
- Bock. „HBV-Resistenz- Aus der Sicht des Virologen.“ *Hepatitis&more*, Februar 2006.
- Bock, CT, HL Tillmann, J Torresi, J Klempnauer, S Locarnini, und MP, et al. Manns. „Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation.“ *Gastroenterology*, 2002: 122:264-273.
- Bock, CT, P Schranz, CH Schroder, und H. Zentgraf. „Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell.“ *Virus Genes*, 1994: 8:215-229.
- Bock, CT, S, Locarnini, S Schwinn, J, Manns, MP Fyfe, F Trautwein, und H Zentgraf. „Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome.“ *J Mol Biol*, 2001: 307:183-196.
- Bonino, F., et al. „Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B.“ *Gut*, 2007: 56(5):699-705.
- Borroto-Esoda, K, S Arterburn, A Snow, und et al. „Final analysis of virological outcomes and resistance during 5 years of adefovir dipivoxil monotherapy in HBeAG-negative patients.“ *J Hepatol*, 2006: 44(Suppl.2):S179.
- Borson, ND, WL Salo, und LR Drewes. „A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR.“ *PCR Methods Appl.*, Nov 1992: 2(2):144-8.
- Bowden, S, K Jackson, M Littlejohn, und S Locarnini. „Quantification of HBV covalently closed circular DNA from liver tissue by real-time PCR.“ *Methods Mol Med*, 2004: 95:41-50.
- Brind, A, et al. „Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection.“ *J Hepatol*, 1997: 26(2):228-235.
- Brunetto, MR, F Oliveri, B Coco, und et al. „Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study.“ *J Hepatol*, 2002: 36:263-270.
- Cacciola, I., T. Pollicino, G. Squadrito, G. Cerenzia, M.E. Orlando, und G. Raimondo. „Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease.“ *N. Engl. J. Med.*, 1999: 341:22-26.

- Chang, MH, et al. „Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group.“ *N Engl J Med*, 1997: 336:1855-1859.
- Chang, T, H Gish, und R De Man. „A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2006: 354:1001-1010.
- Chen, CJ, HI Yang, J Su, und et al. „Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level.“ *JAMA*, 2006: 295:65-73.
- Chen, MT, et al. „A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004: 101(41):14913-8.
- Chin, R, et al. „In vitro susceptibilities of wild-type or drug resistant hepatitis B virus to (-)-beta-D-2,6-diaminopurine dioxolane and 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluracil.“ *Antimicrob Agents Chemother*, 2001: 45:2495-2501.
- Chisari, F.v. „Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity and cancer: lessons from hepatitis B.“ *Am.J.Pathol.*, 2000: 156:1117-1132.
- Chisari, F.V., und C. Ferrari. „Hepatitis B virus immunopathogenesis.“ *Annu. Rev. Immunol.*, 1995: 13: 29-60.
- Classen, M, V Diehl, und K Kochsiek. *Innere Medizin*. Urban und Schwarzenberg, 1994.
- Coates, T, R Wilson, G Patrick, F Andre, und V Watson. „Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines.“ *Clin Ther*, 2001: 23:392-403.
- Colonno, RJ, RE Rose, K Pokornowski, und et al. „Four year assessment of ETV resistance in nucleoside-naive and lamivudine refractory patients.“ *J Hepatol*, 2007: 46:294.
- Cornberg, M, et al. „Aktualisierung der S3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion.“ *AWMF-Register*, 2011: 021/011.
- Cornberg, M., et al. „Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-B-virus-(HBV) Infection: upgrade of the guideline, AWMF-Register 021/011.“ *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2007: 45:525-574.
- Craxi, A, D Di Bona, und C Camma. „Interferon-alpha for HBeAg-positive chronic hepatitis B.“ *J Hepatol*, 2003: 39: S99-S105.
- Dandri, M, MR Burda, H Will, und J Petersen. „Increased hepatocyte turnover inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro does not lead to reduction of the closed circular DNA.“ *Hepatology*, 2000: 32:139-146.
- Dane, D.S., C.H. Cameron, und M. Briggs. „Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis.“ *Lancet*, 1970: 1:695-698.
- de Franchis, R., A. Hadengue, G. Lau, und et al. „EASL Jury. EASL International Consensus Conference on hepatitis B. Consensus statement (long version).“ *J Hepatol*, 2003: 3-25.
- Delaney, WE. „Progress in the treatment of chronic hepatitis B: long-term experience with adefovir dipivoxil.“ *J Antimicrob Chemother*, 2007: 59(5):827-32.
- Delmas, J, et al. „Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virusinfected hepatocytes in vivo and in vitro.“ *Antimicrob Agents Chemother*, 2002: 46:425-433.
- Deterding, K, et al. „Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe.“ *J Med Virol*, 2008: 80(10):1707-11.
- Dienstag, A.L. „Hepatitis B virus infection.“ *N Engl J Med*, 2008: 359(14):1486.
- Doria, M, N Klein, R Lucito, und RJ Schneider. „The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors.“ *EMBO J*, 1995: 14(19):4747-4757.
- El-Serag, H.B. „Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view.“ *J Clin Gastroenterol*, 2002: 35(5 Suppl 2):72-8.
- Enders, GH, D Ganem, und H Varmus. „Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant.“ *Cell*, 1985: 42(1):297-308.
- Erhardt, A, D Blondin, und et al. „Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D.“ *Gut*, 2005: 54(7): 1009-1013.
- Erhardt, A., et al. „Response to interferon alpha is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D.“ *Gut*, 2005: 54(7):1009-13.

- Fattovich, G., F. Bortolotti, und F. Donato. „Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors.“ *J Hepatol*, 2008: 48(2):335.
- Fattovich, G., L. Brollo, G. Giustina, und et al. „Natural history and progression factors for chronic hepatitis type B.“ *Gut*, 1991: 32:294-8.
- Feitelson, MA, B Bonamassa, und A Arzumanyan. „The roles of hepatitis B virus-encoded X protein in virus replication and the pathogenesis of chronic liver disease.“ *Expert Opin Ther Targets*, 2014: 18(3):293-306.
- Frohman, MA. „On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends).“ *PCR Methods Appl.*, Aug 1994: 4(1):S40-58.
- Ganem, D., und H.E. Varmus. „The molecular biology of the hepatitis B viruses.“ *Annu. Rev. Biochem.*, 1987: 56:651-693.
- Gerelsaikhon, T., J.E. Tavis, und V. Bruss. „Hepatitis B virus nucleocapsid development does not occur without genomic DNA synthesis.“ *J. Virol*, 1996: 70:4269-4274.
- Gerlich WH, Kann M. *Hepatitis B In: Topley & Wilson Mikrobiologie & Microbial Infections*. London: BJ Maly & V. ter Menlen eds. Hodster Arnold, 2005.
- Gerlich, Gerlich und. 2005.
- Gerlich, W.H., und W.S. Robinson. „Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'terminus of its complete DNA strand.“ *Cell*, 1980: 21:801-809.
- Gomaa, A.I., S.A. Khan, M.B. Toledano, I. Waked, und S.D. Taylor-Robinson. „Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis.“ *World J Gastroenterol*, 2008: 14(27):4300.
- Guan, R. „Interferon monotherapy in chronic hepatitis B.“ *J Gastroenterol Hepatol*, 2000: 118:83-103.
- Guettoche, T., und H.J. Hnatsyszyn. „Chronic hepatitis B and viral genotype: the clinical significance of determining HBV genotypes.“ *Antivir Ther*, 2005: 10(5):593-604.
- Guidotti, L.G., und F.V. Chisari. „To kill or to cure: options in host defense against viral infection.“ *Curr Opin Immunol*, 1996: 8(4):478-83.
- Guidotti, L.G., und T., et al. Ishikawa. „Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes.“ *Immunity*, 1996: 4(1):25-36.
- Guo, JT, et al. „Apoptosis regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections.“ *J Virol*, 2000: 74:1495-1505.
- Gutfreund, K, et al. „Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance.“ *J Hepatol*, 2000: 33:469-475.
- Ha, NB, RT Garcia, und et. al. „Renal dysfunction in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil.“ *Hepatology*, 2009: 50: 727-734.
- Hadziyannis, S, N Tassopoulos, TT Chang, und et al. „Long-term adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: Results after 5 years of therapy.“ *Hepatology*, 2005: 42(4 Suppl.1):754A (abstract#LB14).
- Hadziyannis, S.J., et al. „Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years.“ *Gastroenterology*, 2006: 131(6):1743-51.
- Hadziyannis, SJ, und GV Papatheodoridis. „Treatment of HBeAg negative chronic hepatitis B with new drugs (adefovir and others).“ *J Heptol*, 2003: v.39 (Suppl 1): 172-176.
- Hadziyannis, Stephanos J. „Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African Countries.“ *Journal of Hepatology*, 2013: 55, 1: 183–191.
- Hagen, TM, et al. „Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994: 91:12808-12812 .
- Hashimoto, Y, F Suzuki, M Hirakawa, und et al. „Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy.“ *J Med Virol*, 2010: 82: 684-691.
- Hatakeyama, Tsuyoshi et al. „Serum HBV RNA is a Predictor of Early Emergence of the YMDD Mutation in Patients Treated with Lamivudine.“ *Hepatology*, 2007: 45: 1179-1186.
- Heathcote, EJ, P Marcellin, und M, et al Buti. „Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B.“ *Gastroenterology*, 2011: 140: 132-143.
- Henkler, F, et al. „Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein.“ *J Gen Virol*, 2001: 82(Pt4):871-882.

- Hirsch, R., J. Lavine, L. Chang, H. Varmus, und D. Ganem. „Polymerase gene products of Hepatitis B Viruses are required for genom RNA packaging as well as for reverse transcription.“ *Nature*, 1990: 344:552-555.
- Huovila, A.P., und A.M., et al. Eder. „Hepatitis B surface antigen assembles in post-ER, pre-Golgi compartment.“ *J Cell Biol*, 1992: 118(6): 1305-20.
- Hussain, M, CJ Chu, E Sablon, und AS Lok. „Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promotor variants.“ *J Clin Microbiol*, 2003: 41(8):3699-705.
- Hyams, K.C. „Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review.“ *ClinInfectDis*, 1995: 20(4): 992-1000.
- Iloeje, UH, HI Yang, J Su, CL Jen, You SL, und CJ Chen. „Predicting cirrhosis risk based on the level fo circulating hepatitis B viral load.“ *Gastroenterology*, 2006: 130:678-86.
- Kairat, A., W. Beerheide, G. Zhou, Z-Y. Tang, L. Edler, und C.H. Schröder. „Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age.“ *Intervirology*, 1999: 42:228-237.
- Kann, M., B. Sodeik, und et al. „Phosphorylation-dependent binding fo hepatis B virus core particles to the nuclear pore complex.“ *J Cell Biol*, 1999: 145(1):45-55.
- Kann, M., und W.H. Gerlich. „Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus.“ *J. Virol.*, 1994: 68:7993-8000.
- Kao, J.H., N.H. Wu, P.J. Chen, M.Y. Lai, und D.S. Chen. „Hepatitis B genotypes and the response of interferon therapy.“ *J Hepatol*, 2000: 33(6):998-1002.
- Kao, J.H., und D.S. Chen. „The natural history of hepatitis B virus infection.“ *Hepatitis B virus. London: International Medical Press*, 2002: 1612-72.
- Kaplan, P.M., R.L. Greenman, und et al. „DNA polymerase associated with human hepatis B antigen.“ *J. Virol*, 1973: 12(5):995-1005.
- Kazim, S.N., S.M. Wakil, L.A. Khan, S.E. Hasnain, und S.K. Sarin. „Vertical transmission of hepatitis B virus despite maternal lamivudine therapy.“ *Lancet*, 2002: 359(9316):1488-9.
- Kirishima, T, et al. „Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment.“ *J Hepatol*, 2002: 37: 259-265.
- Köck, J., L. Theilmann, P. Galle, und H-J. Schlicht. „Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus.“ *Hepatology*, 1996: 23:405-413.
- Köck, J., und H.J. Schlicht. „Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectios entry into hepatocytes does not depend on a viral poylmerase activity.“ *J. Virol.*, 1993: 67:4867-4874.
- Kondili, L.A., H. Osman, und D. Mutimer. „The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases).“ *J. Viral. Hepat.*, 2004: 11:427-431.
- Kong, LN, B Qin, Q Ma, L Li, und Y. Yao. „The relationship between hepatitis B virus genotype B and C and response to interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis B patients: a meta-analysis.“ *J Gastroenterol Hepatol.*, 2014: doi: 10.1111/jgh.12559.
- Kramvis, A., und M.C. Kew. „Structure and function of the encapsidation signal fo hepadnaviridae.“ *J. Viral. Hepat.*, 1998: 5(6):357-67.
- Krogsgaard, K. „The long-term effect of treatment with interferon-alpha2a in chronic hepatitis B. The European Study Group on Viral Hepatitis (EUROHEP). Executive Team on Anti-Viral Treatment.“ *J Viral Hepat*, 1998: 5:389-97.
- Kumar, M, et al. „A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B.“ *Hepatology*, 2007: 45:97-100.
- Lada, O., et al. „Low rate of delayed response in lamivudine experienced HIV/HBV co-infected patients treated with enofovir disoproxil fumarate (TDF).“ *Journal of Hepatology*, 2008: 48(Suppl.2):S259(abstract 695).
- Lai, C.L., E. Gane, C.W. Hsu, und et al. „Two-year results from the GLOBE trial in patients with hepatitis B: Greater clinical and antiviral efficacy to telbivudine (LdT) vs. lamivudine.“ *Hepatology*, 2006: 44:222A.
- Lai, CL, D Shouval, AS Lok, und et al. „Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2006: 354:1011-20.

- Lai, CL, et al. „Telbivudine Phase II Investigator Group. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B.“ *Gastroenterology*, 2005: 129(2):528-36.
- Lai, CL, J Dienstag, E Schiff, und et al. „Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B.“ *Clin Infect Dis*, 2003: 36:687-96.
- Lampertico, P, M Viganò, E Manenti, M Iavarone, E Sablon, und M. Colombo. „Low resistance to adefovir combined with lamivudine: a 3-year study of 145 lamivudine-resistant hepatitis B patients.“ *Gastroenterology*, 2007: 133(5):1445-51. .
- Landers, T.A., H.B. Greenberg, und Robinson W.S. „Structure fo hepatitis B Dane particle DNA and natur of endogenous DNA polymerase reaction.“ *J. Virol.*, 1977: 23:368-376.
- Lara-Pezzi, E, et al. „The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis.“ *Hepatology*, 2001: 33(5):1270-1281.
- Laras, A., J. Koskinas, E. Dimou, A. Kostamena, und J. Hadziyannis. „Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B visus DNA in chronically infected patients.“ *Hepatology*, 2006: 44: 694-702.
- Lau, G.K., et al. „Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2005: 30;352(26):2682-95.
- Lau, GK, F Bonino, und et al. „Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2004: 351:1206-17.
- Lee, W.M. „Hepatitis B virus infection.“ *N Engl J Med*, 1997: 337(24): 1733-45.
- Lee, YS, et al. „Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy.“ *Hepatology*, 2006: 43(6):1385-91.
- Liaw, YF, JJ Sung, WC Chow, und et al. „Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 1996: 351:1521-31.
- Liu, CJ, JH Kao, und DS. Chen. „Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes.“ *Liver Int.* , 2005: 25(6):1097-107.
- Lo, AO, und GL Wong. „Current developments in nucleoside/nucleotide analogues for hepatitis B.“ *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014: Epub ahead of print.
- Locarnini, S, A Hatzakis, J Heathcote, und et al. „Management fo the antiviral resistance patients with chronic hepatitis B.“ *Antivir Ther*, 2004: 9:679-93.
- Locarnini, S, J McMillan, und A Bartholomeusz. „The hepatitis B virus and common mutants.“ *Semin Liver Dis*, 2003: 23;5-20.
- Lok, A.S., und B.J. McMahon. „Chronic hepatitis B.“ *Hepatology*, 2007: 45:507-39.
- Lok, AS, und BJ McMahon. „Chronic hepatitis B: update of recommendations.“ *Hepatology*, 2004: 39:857-861.
- Lok, AS., und Locarnini S., et al. Zoulim F. „Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management.“ *Hepatology*, 2007: 46: 254-65.
- Lu, L, et al. „Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients.“ *J Viral Hepat*, 2009: 16:104-112.
- Lutwick, LI, und WS Robinson. „DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction.“ *J Virol*, 1977: 21(1):96-104.
- MacCallum, F.O., A.M. McFarlan, J.A. Miles, M.R. Pollock, und Wilson C. „Infective Hepatitis; studies in East Anglia during the period 1943-47.“ *Spec.Rep.Ser.Med.Res.Counc.(G.B.)*, 1951: 273:1-144.
- Manesis, E.K., G.V. Papatheodoridis, V. Sevastianos, E. Cholongitas, C. Papaioannou, und S.J. Hadziyannis. „Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection.“ *Am J Gastroenterol*, 2003: 98(10):2261-7.
- Manesis, E.K., und S.J. Hadziyannis. „Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B.“ *Gastroenterology*, 2001: 121:101-109.

- Marcellin, P, EJ Heathcote, M Buti, und et al. „Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2008: 359: 2442-2455.
- Marcellin, P, et al. „Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.“ *N Engl J Med*, 2003: 27;348(9):808-16.
- Marcellin, P, T Chang, und S Lim. „Increasing serologic, virologic, and biochemical response over time to adefovir dipivoxil 10mg in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients.“ *J Hepatol*, 2005: 42(Suppl.2):31.
- Marion, P.L., L.S. Oshiro, und D.C., Scullard, G.H., Robinson W.S. Regnery. „A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of human.“ *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1980: 77:2941-2945.
- Mason, W.S., G. Seal, und J. Summers. „Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.“ *J. Virol*, 1980: 36:829-836.
- Mauss, S, und H Wedemeyer. „HBV-Resistance and implications for therapeutic strategies.“ In *Hepatology - A clinical textbook*, von Berg, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer Mauss, 146. Flying Puplicher, 2009.
- McMahon, BJ, et al. „Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state.“ *J Infect Dis*, 1985: 151:599-603.
- Mello, FCA, BV Lago, LL Lewis-Ximenez, CA Fernandes, und SA Gomes. „Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients.“ *BMC Microbiology*, 2012: 12:96.
- Moradpour, D., und J.R. Wands. „Understanding hepatitis B virus infection.“ *N Engl J Med*, 1995: 332(16): 1092-3.
- Nassal, M, und H. Schaller. „Hepatitis B virus replication.“ *Trends Microbiol*, 1993: 1(6):221-8.
- Nelson, M, S Portsmouth, und J Stebbing. „An open-label study of tenofovir in HIV-1 and hepatitis B virus co-infected individuals.“ *AIDS*, 2003: 17:F7-F10.
- Newbold, J, et al. „The covalently closed duplex form of the hepadenavirus genome exists in isute as a heterogeneous population of viral minichromosomes.“ *J Virol*, 1995: 69:3350-3357.
- Niederrau, C., et al. „Longterm follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B.“ *N Engl J med*, 1996: 30;334(22):1422-7.
- Norder, H, AM Courouce, und LO Magnus. „Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.“ *Virology*, 1994: 198(2):489-503.
- Olotu, C. „Analyse von virusspezifischen Resistenzfaktoren und phylogenetischer Entwicklung von Hepatitis B Viren unter Therapie mit Adefovir.“ 2008.
- Osiowy, C, JP Villeneuve, EJ, Gilles, E Heathcote, und J Borlang. „Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in sampels from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2).“ *J Clin Micobiol*, 2006: 44(6):1994-7.
- Pallas, J.R., D. Farinas-Alvarez, und D., Delgado-Rodriguez, M. Prieto. „Coinfections by HIV, hepatitis B, and hepatitis C in imprisoned injecting drug users.“ *Eur J Epidemiol*, 1999: 15(8):699-704.
- Perrillo, R, et al. „Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants.“ *Hepatology*, 2000: 32(1):129-34.
- Peters, MG, et al. „Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B.“ *Gastroenterology*, 2004: 126: 91-101.
- Poethko-Muller, C., R. Kuhnert, und M. Schlaud. „Vaccination coverage and predictors for vaccination level. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KIGGS).“ *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2007: 50(5-6):851.
- Previsani, N. u. L., D. „Hepatitis B.“ New York: WHO, 2002. 1-76.
- Prince, A.M. „An antigen detected in the blood during incubation period of serum hepatitis.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1968: 60: 814-821.
- Rantala, M, und M.J. van der Laar. „Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review.“ *Euro Surveill*, 2008: 13(23).



- Reijnders, JG, RA De Man, SD Pas, M Schutten, und HL Janssen. „Entecavir: A rescue therapy for chronic hepatitis B patients with a limited virological response to adefovir?“ *Hepatology*, 2007: 46, No.4 (Suppl 1):660A, Abstract No.951.
- Reijnders, JG, et al. „Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues.“ *J Hepatol.*, 2010: 52(4):493-500.
- Robert Koch Institut. „Epidemiologisches Bulletin.“ 2011.
- Robinson, W.S. „Genetic variation among hepatitis B and related viruses.“ *Ann N.Y. Acad Sci*, 1980: 371-378.
- Rokuhara, A, et al. „Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy.“ *J Gastroenterol*, 2006: 41:785-790.
- Safadi, R, et al. „Efficacy of switching to telbivudine in chronic hepatitis B patients treated previously with lamivudine.“ *Liver Int.*, 2011: 31(5):667-75. .
- Sallie, R. „Selective detection of hepatitis B virus RNA by PCR.“ *Genome Res*, 1994: 3:376-377.
- Sanger, F, S Nicklen, und AR Coulson. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.“ *Biotechnology*, 1977: 24:104-108.
- Schildgen, O., et al. „Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir.“ *N Engl J Med*, 2006: 354(17):1807-12.
- Schildgen, Oliver. „Acute and chronic hepatitis B - Diagnostic tests.“ In *Hepatology - A clinical textbook*, 113-118. 2009.
- Seeger, C, F Zoulim, und WS Mason. „Hepadnaviruses.“ In *Fields virology*, von DM Knipe und et al., 2977-3029. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Seeger, C., und W.S. Mason. „Hepatitis B virus biology.“ *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000: 64(1):51-68.
- Seeger, C.D., D. Ganem, und et al. „Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.“ *Science*, 1986: 232(4749):477-84.
- Seigneres, B, C Pichoud, SS Ahmed, O Hantz, C Trepo, und F Zoulim. „Evolution of hepatitis B virus polymerase gene sequence during famciclovir therapy for chronic hepatitis B.“ *J Infect Dis*, 2000: 181: 1221-1233.
- Seo, YS, et al. „Antiviral efficacy of adefovir dipivoxil versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B sequentially treated with lamivudine and adefovir due to lamivudine resistance.“ *World J Gastroenterol*, 2007: 14;13(30):4072-9.
- Shaw, T, A Bartholomeusz, und S Locarnini. „HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation.“ *J Hepatol*, 2006: 44:593-606.
- Sherman, M, C Yurdaydin, und J, et al. Sollano. „Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B.“ *Gastroenterology*, 2006: 130:2039-49.
- Singh, M, A, Wakil, AE Dicaire, C Luscombe, und SL Sacks. „Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR.“ *J Virol Methods*, 2004: 118:159-167.
- Sprengel, R., E.F. Kaleta, und H. Will. „Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons.“ *J. Virol*, 1988: 62: 3832-3839.
- Standing, D. N., J. H. Ou, und et al. „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*, 1988: 85(22): 8405-8409.
- Stevens, C.E., R.P. Beasley, TsuiJ, und WC. V Lee. „Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan.“ *N Engl J Med*, 1975: 292(15):771.
- Stibbe, W., und W.H. Gerlich. „Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors.“ *Virology*, 1982: 123(2):436-42.
- Stoll-Becker, S, et al. „Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients.“ *J Virol*, 1997: 71:5399-5407.
- Stuyver, LJ, et al. „Nomenclature for antiviral resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region.“ *Hepatology*, 2001: 33:751-757.
- Su, Qin, Shu-Fang Wang, Tian-En Chang, und et al. „Circulating Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Chronic Infection: Representation of Differently Polyadenylated Viral Transcripts during Progression to Nonreplicative Stages.“ *Clin Cancer Res*, 2001: 7:2005-2015.
- Summers, J., J.M. Smolec, und R. Snyder. „A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978: 75: 4533-4537.

- Sun, X, W Qin, R Zhou, L Wang, Y Li, und L Zhao. „Effect of conventional interferon- $\alpha$  in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis.“ *J Evid Based Med.*, 2010: 3(4):220-5.
- Sung, JJ, et al. „Lamivudine compared with lamivudine and adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B.“ *J Hepatol.*, 2008: 48(5):728-35.
- Sung, JY, et al. „Intrahepatic Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Can Be a Predictor of Sustained Response to Therapy.“ *Gastroenterology*, 2005: 128:1890-1897.
- Szmunn, W., et al. „Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States.“ *N. Engl. J. Med.*, 1980: 303: 833-841.
- Tamori, A., et al. „Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus.“ *Hepatology*, 1999: 29:1429-1434.
- Tang, J.R., H.Y. Hsu, und H.H., et al. Lin. „Hepatitis B surface antigenemia at birth: A long-term follow-up study.“ *J Pediatr*, 1998: 133:374-7.
- Tenney, DJ, SM Levine, RE Rose, und et al. „Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine.“ *Antimicrob Agents Chemother*, 2004: 48:3498-507.
- Thimme, R, et al. „CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection.“ *J Virol*, 2003: 77:68-76.
- Tillmann, H. L. „Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection.“ *World Journal of Gastroenterology*, 2007: 13:125-140.
- Tillmann, HL, C, Bock, T Trautwein, KHW Böker, E Jäckel, M Glowienka, und K Oldhafer. „Mutational pattern of hepatitis B virus on sequential therapy with famciclovir and lamivudine in patients with hepatitis B virus reinfection occurring under HBIG Immunoglobulination after liver transplantation.“ *Hepatology*, 1999: 30:244-256.
- Tillmann, HL, et al. „Safety and efficacy of lamivudin in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience.“ *J Viral Hepat*, 2006: 13:256-263.
- Tsuge, M, et al. „Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients.“ *J Gastroenterol.*, 2013: 48(10):1188-204.
- Van Bommel, F, B Zoellner, B Moeller, und et al. „Is tenofovir effective in treatment of adefovir resistant hepatitis B virus infections?“ *Hepatology*, 2006: 44, 567A.
- Villeneuve, JP, et al. „Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient.“ *J Hepatol.* , 2003: 39(6):1085-9.
- Wai, C.T., C.J. Chu, M. Hussain, und A.S. Lok. „HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C.“ *Hepatology*, 2002: 36:1425-1430.
- Walker, Christine. „Therapie der chronischen Hepatitis B Virus Infektion: Geno- und phänotypisch Analyse der Selektion von Resistenzmutationen unter antiviraler Therapie mit Nukleos(tid)analoga.“ Dissertation, 2011.
- Wasley, A., S. Grytdal, und K. Gallagher. „Surveillance for acute viral hepatitis, United States.“ *MMWR Surveill Summ*, 2008: 57(2):1.
- Weber, M., und et al. Bronsma V. „Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription.“ *J. Virol.*, 1994: 68(5):2994-9.
- Werle-Lapostolle, B, et al. „Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy.“ *Gastroenterology*, 2004: 126:1750-1758.
- Westland, CR, H Yang, WE 4th Delaney, CS Gibbs, MD Miller, und et al. „Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B.“ *Hepatology*, 2003: 38(1):96-103.
- WHO. „Fact sheet Hepatitis B No.204.“ 2012.
- Wiegand, J, D Hasenclever, und HL Tillmann. „Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence.“ *Antivir Ther*, 2008: 13(2): 211-20.
- Will, H, et al. „Replication strategy of human hepatitis B virus.“ *J Virol*, 1987: 61(3):904-911.
- Wong, D.K., A.M. Cheung, K. O'Rourke, und et al. „Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.“ *Ann Intern Med*, 1993: 119:312-23.

- Wu, T-T, L Coates, CE Aldrich, J Summers, und WS Mason. „In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway.“ *Virology*, 1990: 175:255-261.
- Yotsuyanagi, H., K. Yasuda, S. Iino, und et al. „Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B.“ *Hepatology*, 1998: 27(5):1377.
- Yu, JW, LJ Sun, YH, Kang, P Zhao, und SC Li. „The Study of Efficacy of Lamivudine in Patients with Severe Acute Hepatitis B.“ *Dig Dis Sci*, 3. Dec 2009.
- Yuen, LK, et al. „SeqHepB: a sequence analysis program and relational database system for chronic hepatitis B.“ *Antiviral Res*, 2007: 75:64-74.
- Yuen, M.F., et al. „Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications.“ *Gut*, 2005: 54:1610-1614.
- Yuen, MF, DY Fong, DK Wong, und et al. „Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response.“ *Hepatology*, 2007: 46:1695-1703.
- Zhang, W., H.J. Hacker, M. Tokus, Th. Bock, und C.H. Schröder. „Patterns of Circulating Hepatitis B Virus Serum Nucleic Acids During Lamivudine Therapy.“ *J. Med. Virol.*, 2003: 71: 24-30.
- Zhang, Z, N Torii, Z Hu, J Jacob, und TJ Liang. „X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo.“ *J Clin Invest*, 2001: 108(10):1523-1531.
- Zhong, M., J. Hou, und K. Luo. „Identification of vertical transmission of hepatitis B virus from mother to children by direct sequencing a segment of surface gene of hepatitis B virus.“ *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1996: 76(3): 194-6.
- Zöllner, B, A Stoehr, A Plettenberg, HH Feucht, M, Schäfer, P Schröter, und R Laufs. „In vivo dynamics and pathogenicity of wild-type and resistant hepatitis B virus during long-term lamivudine monotherapy - a clinical note.“ *J Clin Virol*, 2000: 17:183-188.
- Zöllner, B, et al. „Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment.“ *Clin Infect Dis*, 2002: 34:1273-1277.
- Zöllner, B, J Petersen, E Puchhammer-Stöckl, J Kletzmayr, M Sterneck, und L Fischer. „Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D.“ *Hepatology*, 2004: 39:42-50.
- Zöllner, B, J Petersen, M, Laufs, R Schröter, und V, Feucht, HH Schoder. „20-fold increase in the risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw.“ *Lancet*, 2001: 357:934-935.
- Zoulim, F, J Saputelli, und C Seeger. „Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.“ *J Virol*, 1994: 68(3):2026-2030.
- Zoulim, F., und C. Seeger. „Reverse transcription in Hepatitis B Virus is primed by a tyrosine residue of the polymerase.“ *J. Virol.*, 1994: 68:6-13.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Martin Wolf konzipierte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Bock und Herrn Dr. Köberlein die Studienexperimente. Eigenständig führte er Datenrecherche und Vorversuche durch, arbeitete sich in die verwendeten Labormethoden ein, verbesserte diese und etablierte neue Methoden. Bei der HBV-PCR wurde er von Frau Mammato unterstützt. Die Mutationsanalysen fanden unter seiner Federführung gemeinsam mit Herrn Janke statt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Martin Wolf und Frau Matschke. Herr Professor Bock betreute die Arbeit und korrigierte das Manuskript.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des langen Entstehungsprozesses dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. rer. nat. C.-Thomas Bock für die Vergabe und die ausgezeichnete Betreuung dieser Doktorarbeit, sowie für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Bei Herrn Professor Dr. med. Reinhard Kandolf bedanke ich mich für den Arbeitsplatzes und die zur Verfügung gestellten Mittel. Für die hilfreiche telefonische Beratung gilt mein Dank Dr. med. Florian van Bömmel. Ein herzliches Dankeschön geht an Christina Matschke für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich möchte mich auch bei denen Personen bedanken, die mir im Labor bei allen Problemen und Herausforderungen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Dazu gehören insbesondere Gerd Janke und Rosa Mammato. Weiterhin Dr. rer. nat. Bernd Köberlein, Dr. rer. nat. Anja Düchting, Dr. rer. nat. Susanne Aberle, Dr. rer. nat. Birgit Haack und Heike Kaiser. Weiterer Dank gilt auch allen MitarbeiterInnen der molekularen Pathologie und molekularpathologischen Diagnostik (Gudrun, Isabell, Karen, Martina, Nora, Patricia, Sandra und Silke). Schließlich möchte ich meinen Eltern, sowie meiner Frau Julia für die geduldige und verständnisvolle Begleitung während den Höhen und Tiefen dieser Arbeit vielen Dank sagen.