

Angefertigt am
Fachbereich 08 - Biologie und Chemie
in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Charakterisierung der phänotypischen Resistenz von Hepatitis-B-Virus Mutanten gegenüber antiviralen Nukleosid- und Nukleotidanaloga

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs 08 - Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hauke Niekamp
Master of Science

Gießen 2013

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif
Institut für Biochemie
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

PD Dr. Dieter Glebe
Institut für Medizinische Virologie
Fachbereich 11 – Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Zurzeit sind etwa 240 Mio. Menschen auf der Welt chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert. Im Gegensatz zu einer akuten Infektion sollte die chronische Hepatitis B therapiert werden, um das Risiko von oft fatalen Folgeerkrankungen zu minimieren. Die Therapie mit Interferon α ist nur bei einem Teil der Patienten erfolgreich. Daher bleibt vielen Patienten nur eine Therapie mit Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase. Diese muss jedoch meist lebenslang erfolgen, da die ungewöhnlich hohe Variabilität dieses DNA-Virus eine Resistenzbildung begünstigt. Deshalb ist eine optimale und individualisierte Therapie von großer Bedeutung. Mithilfe genotypischer Analysen der HBV-Genome können bereits bekannte virale Resistenzmutationen identifiziert und so die antivirale Behandlung angepasst werden. Aber nur mit einer phänotypischen Charakterisierung können neue, bislang unbekannte HBV-Varianten eindeutig identifiziert und mit einer Resistenz verknüpft werden.

Der bereits in der Arbeitsgruppe von PD Dr. D. Glebe am Institut für Medizinische Virologie der Universität Gießen etablierte phänotypische Assay zur viralen Resistenzbestimmung des HBV wurde weiter optimiert, um auch für HBV-Mutanten mit sehr geringer Replikation noch verlässlichere und genauere Resistenzdaten ermitteln zu können. Die Verlässlichkeit des verwendeten Assays konnte in einer Ringstudie mit einer ebenfalls am Projekt beteiligten Arbeitsgruppe bestätigt werden.

Außerdem wurde eine neue Methode für den Replikationsnachweis von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten entwickelt. Zumindest HBV-Isolate mit einer ausreichend starken Replikation können daher jetzt auch unter der vollständigen Kontrolle ihres natürlichen Promotors phänotypisch charakterisiert werden.

Im Rahmen eines vom BMBF-geförderten Projekts zur Molekularen Diagnostik (HOPE-Projekt) wurden in dieser Arbeit 26 HBV-Isolate aus chronisch infizierten Patienten auf ihre Resistenz gegen die vier bedeutendsten antiviralen Medikamente (Lamivudin, Adefovir, Entecavir und Tenofovir) getestet. Ein Großteil der Ergebnisse bestätigte die bisherigen Erkenntnisse über die Resistenzentwicklung. Einige Phänotypen konnten jedoch anhand der bekannten Resistenzmutationen nicht erklärt werden. So wurde eine Kreuzresistenz auf Grundlage der Lamivudin-Resistenzmutationen rtM204I/V gegen Adefovir und Tenofovir detektiert, die außerhalb des HOPE-Projekts bisher nicht beschrieben wurde. Außerdem wurde ein vermindertes Ansprechen auf hohe Entecavirkonzentrationen im phänotypischen Assay festgestellt.

Die außergewöhnlich hohe Adefovir- und Tenofovirresistenz des bereits zuvor charakterisierten multiresistenten Isolats FvB 150-1 war allein mit den bekannten Mutationen rtA181T und rtN236T nicht zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass neben diesen beiden Mutationen der Austausch T76S in der Primerdomäne für die hohen Resistenzen verantwortlich ist. Damit wurde erstmals ein Aminosäureaustausch außerhalb der Reversen Transkriptase der HBV-Polymerase als Resistenzmutation identifiziert.

Unabhängig davon wurden weitere virale Varianten getestet, die in einer kürzlich publizierten Studie beschrieben wurden. Sie wurden gehäuft in Patienten, die während der Therapie einen virologischen Durchbruch der HBV-Infektion erlitten hatten, gefunden und standen daher im Verdacht einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung zu haben. Die ermittelten phänotypischen Daten zeigten jedoch, dass es sich bei den Austauschen rtS78T, rtL229F/V und rtM309K wahrscheinlich nicht um Resistenzmutationen handelte.

Summary

Currently, about 240 million people in the world are chronically infected with the hepatitis B virus. An acute infection does not require a specific therapy, whereas the chronic Hepatitis B has to be treated to minimize the risk of a secondary disease like cirrhosis of the liver and hepatocellular carcinoma. The therapy with interferon α is by far not in all cases successful. Therefore, for many patients remain only an inevitable life-long treatment with reverse transcriptase inhibitors. In addition, the high variability of the virus favors the development of resistance. Hence an optimal adapted therapy is very important. Genotypic analyzes can only identify already known resistance mutations. But the clear link of a new mutation to resistance is only possible with the results of a phenotypic characterization

The already in the group of PD Dr. D. Glebe at the Institute of Medical Virology of the University of Giessen established phenotypic assay for resistance testing was further optimized in order to obtain more reliable and accurate resistance data even with HBV-mutants with very low viral replication. The reliability of the assay was confirmed in a collaborative study with a working group, which is also involved in the project.

In addition, a new PCR-based method for the quantification of the viral replication of 1.5-fold HBV over length constructs was developed. With this qPCR at least HBV isolates with a sufficiently strong replication can be characterized under the full control of its natural promoter to analyze its effect of the replication strength.

In the context of the BMBF-funded HOPE-project 26 isolates from chronic infected patients were tested for their resistance to the four major antiviral drugs (lamivudine, adefovir, entecavir and tenofovir). The majority of the results confirmed the previous findings on the development of resistance. However, some phenotypes could not be explained based on the known resistance mutations. Thus, cross-resistance was detected on the basis of lamivudine resistance mutations rtM204I/V to adefovir and tenofovir and the phenotypic data showed a reduced response on high entecavir concentrations, which both have not been described outside the HOPE-project before.

The extremely high adefovir and tenofovir resistance of the previously characterized multidrug-resistant isolate FvB 150-1 could not be explained solely by the known mutations rtA181T and rtN236T. It could be shown that in addition the substitution T76S located in the priming domain is responsible for this high resistance. The mutation T76S is the first known resistance mutation of HBV, which is located outside of the reverse transcriptase.

Regardless of the HOPE-project the influence of some substitutions were tested, which were described in a recently published study. The mutations were found more often in patient with virological breakthrough than in untreated patients. However, the determined phenotypic data showed that the exchanges rtS78T, rtL229F/V and rtM309K probably not acted as resistance mutations.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatitis-B-Virus.....	1
1.1.1	Geschichte.....	1
1.1.2	Taxonomische Einordnung	1
1.1.3	Morphologie.....	2
1.1.4	Genomorganisation	3
1.1.5	Viraler Replikationszyklus.....	4
1.2	Hepatitis B als Infektionskrankheit	5
1.2.1	Epidemiologie und Infektionsverlauf.....	5
1.2.2	Therapie	6
1.2.3	Entwicklung der Resistenz gegen Nukleos(t)idanaloga.....	8
1.2.4	Resistenzbestimmung	10
1.3	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Puffer und Lösungen.....	12
2.1.2	Antibiotika	13
2.1.3	Medien	13
2.1.4	Nukleosid- und Nukleotidanaloga	14
2.1.5	Enzyme und Kits.....	14
2.1.6	Oligonukleotide.....	15
2.1.7	Längen- und Größenstandard.....	18
2.1.8	Plasmide.....	18
2.1.9	HBV-Isolate des HOPE-Projekts	20
2.1.10	Humane Seren.....	20
2.1.11	Bakterienstamm	20
2.1.12	Zelllinien.....	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	21
2.2.2	Transformation von Bakterien	21
2.2.3	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	21
2.2.4	Sequenzierung.....	21
2.2.5	Agarose Gelelektrophorese	22
2.2.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten.....	22
2.2.7	Restriktionsverdau	22
2.2.8	Polymerasekettenreaktion	23
2.2.9	Quantitative Polymerasekettenreaktion	24
2.2.10	Ortsspezifische Mutagenese.....	28
2.2.11	Klonierungen mit dem <i>In-Fusion HD Cloning System</i>	28
2.2.12	Aufreinigung viraler DNA.....	31
2.2.13	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	32
2.2.14	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	32

2.2.15	Bestimmung der Transfektionseffizienz (SEAP-Test)	32
2.2.16	Phänotypischer Assay zur Resistenzbestimmung	33
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Etablierung einer sensitiveren Amplifikation von viralen Ganzgenomen aus Patientenseren ..	36
3.2	Klonierung und Replikationsnachweis von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukte	37
3.2.1	Etablierung eines PCR-basierten Replikationsnachweises	37
3.2.2	Klonierung von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukten.....	40
3.3	Optimierung der automatisierten DNA-Aufreinigung	41
3.4	Phänotypisierung von HBV-Isolaten aus Seren von chronisch infizierten Patienten.....	42
3.4.1	Vergleich der Inhibitionskurven des Wildtypkonstrukts	43
3.4.2	HBV-Isolate ohne bekannte Resistenzmutationen	44
3.4.3	HBV-Isolate mit Lamivudin-Resistenzmutationen	46
3.4.4	HBV-Isolate mit Entecavir-Resistenzmutationen	50
3.4.5	HBV-Isolate mit Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen.....	52
3.4.6	HBV-Isolat mit einer Insertion in der Reversen Transkriptase	55
3.4.7	Ringstudie zur Verifizierung des phänotypischen Assays.....	56
3.5	Charakterisierung neuer potentieller Resistenzmutationen	58
3.5.1	Einfluss der Mutationen rtL229F/V auf die Resistenzentwicklung.....	59
3.5.2	Einfluss der Mutation rtM309K auf die Resistenzentwicklung.....	59
3.5.3	Einfluss der Mutation rtS78T auf die Resistenzentwicklung.....	60
3.6	Charakterisierung der HBV-Mutanten des Patienten FvB 150.....	61
3.6.1	Genotypische Charakterisierung der viralen Quasispezies	62
3.6.2	Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Klone.....	66
4	Diskussion.....	71
4.1	Erschließung von niedrigtitrigen Patientenseren für die phänotypische Charakterisierung.....	71
4.2	HBV-Konstrukte unter der vollständigen Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren	72
4.3	Optimierung des phänotypischen Assays zur Bestimmung der viralen Resistenz	75
4.4	Einordnung der phänotypischen Daten des HOPE-Projekts	76
4.4.1	Wildtypkonstrukt und HBV-Isolate ohne Resistenzmutationen.....	76
4.4.2	Lamivudinresistenzen	76
4.4.3	Kreuzresistenzen zwischen Lamivudin und den Nukleotidanaloga.....	77
4.4.4	Entecavirresistenzen	77
4.4.5	Resistenzen gegen Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir	78
4.4.6	Insertion in der Reversen Transkriptase.....	79
4.4.7	Auswertung der Ringstudie zur Verifizierung des Assays	79
4.5	Bewertung der Mutationen rtS78T, rtL229F/V und rtM309K	80
4.6	Ursache für die hohen Resistenzen des HBV-Isolats FvB 150-1	81
4.7	Ausblick	83
	Literaturverzeichnis	84
	Abkürzungsverzeichnis	91
	Anhang	93
	Erklärung.....	98
	Lebenslauf	99
	Danksagungen	100

1 Einleitung

1.1 Hepatitis-B-Virus

1.1.1 Geschichte

Im Jahr 1963 wurde von Samuel Blumberg im Blut von australischen Ureinwohnern ein neues Antigen entdeckt (Blumberg et al. 1965). Dieses Australia-Antigen schien gehäuft in Verbindung mit Leukämie, Down-Syndrom und einer Hepatitis aufzutreten (Blumberg et al. 1967). Kurze Zeit später gelang es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Australia-Antigen und der Serumhepatitis herzustellen (Prince 1968). Die 20 nm großen Partikel des Australia-Antigens schienen jedoch keine Nukleinsäuren zu enthalten.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden 1970 zusätzlich zu den bereits bekannten 20 nm großen Partikeln, größere Partikel mit einem Durchmesser von 45 nm entdeckt. Sie enthielten ebenfalls das Australia-Antigen und wurden nach ihrem Entdecker Dane-Partikel genannt (Dane et al. 1970). Ein Jahr später wurden aus diesen Partikeln durch die Behandlung mit Detergenzien die sogenannten Core-Partikel isoliert (Almeida et al. 1971). Im Jahr 1973 entdeckte W.S. Robinson in den Core-Partikeln zunächst eine endogene Polymerase (Kaplan et al. 1973, Robinson und Greenman 1974) und konnte anschließend auch die dazugehörige zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA nachweisen (Robinson et al. 1974, Summers et al. 1975).

Die Dane-Partikel wurden nun als Hepatitis-B-Virus (HBV) und das Australia-Antigen als Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg, *hepatitis B surface antigen*) bezeichnet.

1.1.2 Taxonomische Einordnung

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu den *Hepadnaviridae* (Mason et al. 2005). Charakteristisch für diese Virusfamilie sind eine hohe Wirtsspezifität sowie ein ausgeprägter Lebertropismus (Robinson 1991). Die Virusfamilie wird in die beiden Gattungen *Orthohepadnaviridae* (Viren der Säugetiere) und *Avihepadnaviridae* (Viren der Vögel) unterteilt. Neben dem humanen HBV, wurden weitere Vertreter der *Orthohepadnaviridae* zum Beispiel in Altweltaffen wie dem Schimpansen (Vaudin et al. 1988) oder dem Orang-Utan (Warren et al. 1999) aber auch im Wollaffen (Lanford et al. 1998), einem Vertreter der Neuweltaffen sowie in Fledermäusen (Drexler et al. 2013, He et al. 2013) gefunden. Außerdem wurden Viren dieser Gattung in Nagetieren der Familie der *Scuridae* (Hörnchen) wie dem Nordamerikanischen Waldmurmeltier (Summers et al. 1978) und dem Nördlichen Spitzhörnchen (Marion et al. 1980) entdeckt. Vertreter der *Avihepadnaviridae* wurden zum Beispiel in der Pekingente (Mason et al. 1980) und der Schneegans (Chang et al. 1999) gefunden.

Das humane Hepatitis-B-Virus wird in neun Genotypen (A bis I) unterteilt. Innerhalb der Genotypen A bis D und F findet zusätzlich eine Einteilung in Subgenotypen statt. (Norder et al. 2004, Yu et al. 2010). Das virale Genom der Genotypen unterscheidet sich zu mindestens 8 % und das der Subgenotypen zu mindestens 4 % (Schäfer et al. 2009).

1.1.3 Morphologie

Das Hepatitis-B-Virus ist ein umhülltes Virus. Neben den Virionen mit einem Durchmesser von 42 nm existieren außerdem die in ihrer Länge variablen Filamente sowie Sphären mit einem Durchmesser von ca. 22 nm, die zusammen als subvirale Partikel bezeichnet werden (Robinson 1977).

Die äußere Hülle der Virionen und die subviralen Partikel bestehen aus drei viralen Oberflächenproteinen, die in eine Lipidmembran eingebettet sind. Die drei Proteine haben das gleiche carboxyterminale Ende, unterscheiden sich jedoch N-terminal. Das kleine Oberflächenprotein (SHBs) besteht lediglich aus der S-Domäne, das mittlere Oberflächenprotein (MHBs) besteht aus der S- und PräS2-Domäne und das große Oberflächenprotein (LHBs) besteht aus der S-, der PräS1- und der PräS2-Domäne. Den Hauptbestandteil der äußeren Hülle der Virionen und der subviralen Partikel stellt das SHBs dar. Der Anteil des LHBs ist in den Sphären geringer als in den Virionen und Filamenten. Dem MHBs konnte bislang keine eindeutige Funktion zugewiesen werden (Glebe und Urban 2007). In den Virionen kann das LHBs zwei verschiedene Topologien annehmen. Die präS-Domänen können für die Interaktion mit dem Core-Partikel in das Lumen oder für die Interaktion mit dem spezifischen HBV-Rezeptor nach außen gerichtet sein (Bruss et al. 1994).

Im Vergleich zu den Virionen werden die subviralen Partikel in infizierten Patienten meist in einem 1.000-fachen Überschuss gefunden. Da sie jedoch weder Core-Partikel noch eine virale Nukleinsäure enthalten, sind sie nicht infektiös (Ganem 1991).

Im Inneren der Virionen befindet sich das Core-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 32 nm. Es besteht aus 180 oder 240 Core-Proteinen und weist dementsprechend eine ikosaedrische T3- oder T4-Symmetrie auf (Crowther et al. 1994, Kenney et al. 1995, Dryden et al. 2006, Seitz et al. 2007). Das Core-Partikel enthält das ca. 3,2 kb große, partiell doppelsträngige DNA-Genom, das kovalent mit der Polymerase verbunden ist (Gerlich und Robinson 1980, Bartenschlager und Schaller 1988). Die Polymerase besteht aus der Primerdomäne, der Spacerdomäne, der Reversen Transkriptase und der RNaseH (Bartenschlager und Schaller 1988, Radziwill et al. 1990).

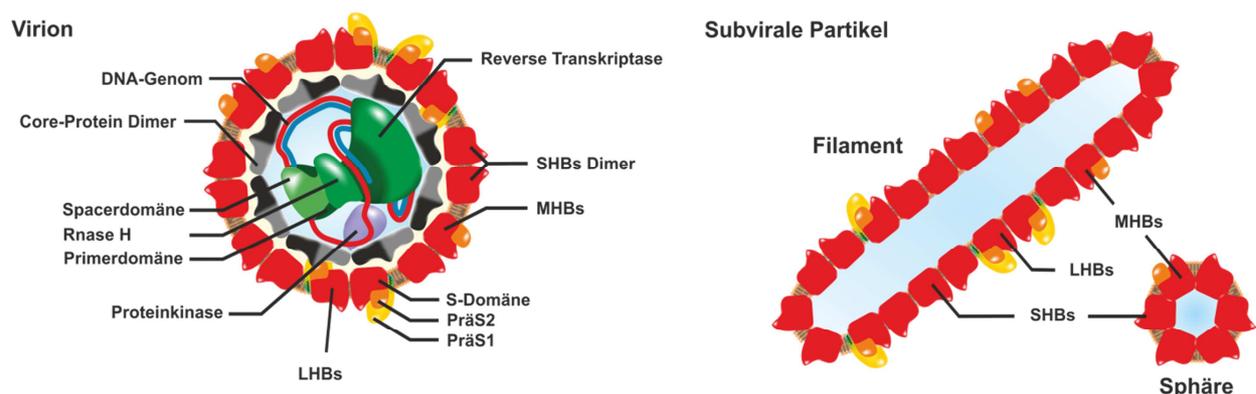


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Morphologie von Virionen und subviralen Partikeln (Filamente und Sphären). Dargestellt sind die PräS1- (gelb), das PräS2- (orange) und S-Domäne (rot) der Oberflächenproteine (SHBs, MHBs und LHBs) sowie die Core-Proteine (schwarz-grau). Außerdem ist die Polymerase (grün) mit ihren Domänen (Primer, Spacer, Reverse Transkriptase und RNaseH), das DNA-Genom (rot-blau) und eine Proteinkinase (lila) gezeigt. Abbildung verändert nach Glebe und Bremer (2013).

1.1.4 Genomorganisation

Das Hepatitis-B-Virus hat mit ca. 3,2 kb eins der kleinsten bisher gefundenen Virusgenome, wobei die exakte Länge je nach Genotyp leicht variiert (Summers et al. 1975, Schäfer 2007). Aufgrund der unvollständigen Synthese des Plusstrangs variiert dessen Länge am 3'-Ende (Hruska et al. 1977, Landers et al. 1977). Das 5'-Ende beginnt dagegen immer mit einem 18 nt langen RNA-Fragment mit einer Cap-Struktur, das als Primer für die Zweitstrangsynthese dient (Seeger et al. 1986). Der kodierende Minusstrang ist vollständig vorhanden und besitzt an den Enden kurze 10 bp lange redundante Bereiche. An sein 5'-Ende ist die Primerdomäne der Polymerase gebunden (Bartenschlager und Schaller 1988). Die zirkuläre Struktur des Genoms wird durch eine 240 bp umfassende Überlappung der beiden Stränge und nicht durch die kovalente Bindung der Enden des Minusstrangs erreicht (Sattler und Robinson 1979).

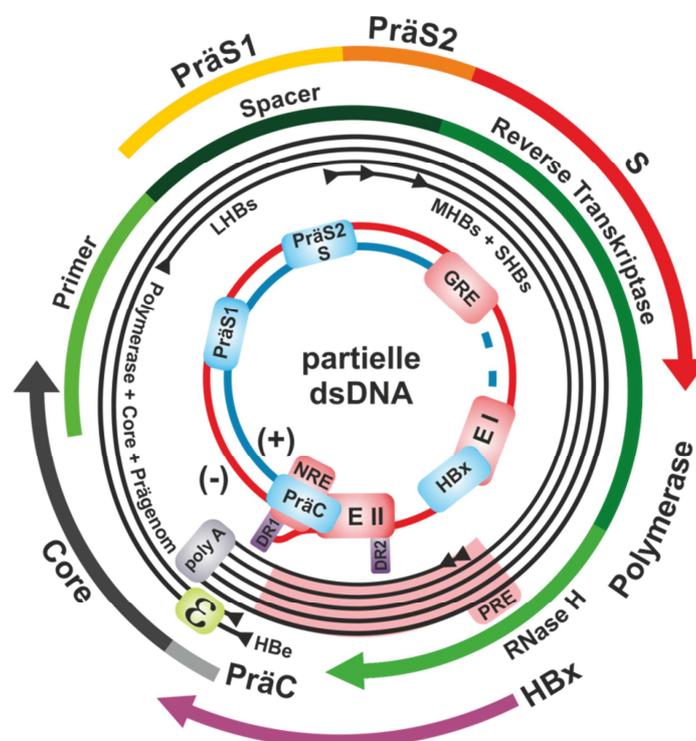


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der HBV-Genomorganisation. Dargestellt ist der Minusstrang (rot) und der Plusstrang (blau) des partiell doppelsträngigen DNA-Genoms mit den Promotoren (hellblau) sowie den Enhancern (E I + E II) dem Glucocorticoid-Responsive-Element (GRE), dem negativ regulatorischen Element (NRE) (alle rot) und den direkten Sequenzwiederholungen DR1 und DR2 (lila). Die pgRNA und die restlichen mRNAs (beide schwarz) sind mit dem PolyA-Ende (hellgrau), dem Enkapsidierungssignal ϵ (grün) und dem posttranskriptionalen Regulationselement (PRE, rot) gezeigt. Außerdem sind die vier ORFs zu sehen: Polymerase (grün), Oberflächenproteine (gelb-orange-rot), X-Protein (lila) und Core-Protein (grau). Abbildung verändert nach Glebe und Bremer (2013).

Das Virus hat vier sich überlappende offene Leserahmen (ORFs, *open reading frames*) und transkribiert fünf verschiedene virale RNAs, die zellulären mRNAs ähneln. Das virale Genom enthält nur ein Polyadenylierungssignal, daher haben alle viralen mRNAs das gleiche 3'-Ende (Tiollais et al. 1985). Die prägenomische RNA (pgRNA) umfasst etwas mehr als das gesamte Genom. Sie dient als Vorlage für die Replikation des Genoms, stellt aber auch die Matrize für die Synthese der Polymerase und des HBe (Core-Protein) dar. Durch einen vorverlegten Transkriptionsstart wird die präCmRNA gebildet. Sie wird

in eine sekretierte Form des HBc, das HBe translatiert. Der ORF der Oberflächenproteine enthält drei Translationsstartpunkte, wobei MHBs und SHBs von der gleichen mRNA translatiert werden. Für das LHBs wird eine eigene längere mRNA transkribiert. Eine weitere kurze mRNA wird für die Produktion des X-Protein gebildet (Ganem und Varmus 1987).

Die Transkription wird von vier Promotoren, zwei Enhancern (Tang et al. 2001) sowie einem Glucocorticoid-Responsive-Element (Tur-Kaspa et al. 1988) und einem negativen regulatorischen Element (Park et al. 1997) gesteuert. Das Enkapsidierungssignal ϵ ist für die Erkennung der prägenomische RNA durch die Polymerase (Laskus et al. 1994) sowie auch für die anschließende Verpackung in die Kapside (Bartenschlager et al. 1990) von Bedeutung. Die direkten Sequenzwiederholungen DR1 und DR2 (*direct repeats*) sind für die Replikation des Genoms nötig und das posttranskriptionale Regulationselement (PRE) verhindert das Splicen der mRNAs (Huang und Liang 1993).

1.1.5 Viraler Replikationszyklus

Das Hepatitis-B-Virus bindet zunächst an Heparansulfat-Proteoglykane, die als initiale Rezeptoren mit niedriger Affinität dienen (Schulze et al. 2007, Leistner et al. 2008, Sureau und Salisse 2013). Im nächsten Schritt folgt die hochspezifische Bindung an den einen Rezeptor, bei dem es sich um den Leberspezifischen Gallensäure-Transporter NTCP (*sodium-taurocholate cotransporting polypeptide*) handelt (Yan et al. 2012). Der anschließende zelluläre Aufnahmemechanismus in die Zelle ist noch immer unbekannt. Nach der Aufnahme in die Zelle wird das Nukleokapsid in das Zytosol freigelassen und über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Rabe et al. 2006). Dort erfolgt innerhalb der Kernporen der Zerfall des Core-Partikels und das Genom wird aktiv in den Kern entlassen (Rabe et al. 2003).

Die partiell doppelsträngige DNA (rcDNA, *relaxed circular*) aus dem Nukleokapsid wird im Kern mit Hilfe der zellulären DNA Polymerase und weiterer Reparaturenzyme in die kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA, *covalently closed circular*) umgewandelt (Köck und Schlicht 1993). Die cccDNA liegt im Zellkern assoziiert mit Histonen als Minichromosom vor (Bock et al. 1994, Newbold et al. 1995). Die cccDNA wird von der zellulären RNA Polymerase II in die pgRNA sowie die weiteren mRNAs transkribiert (Rall et al. 1983).

Die virale Polymerase bindet an das Enkapsidierungssignal ϵ der pgRNA und wird anschließend zusammen mit dieser durch Core-Proteine zu unreifen Nukleokapsiden verpackt (Junker-Niepmann et al. 1990, Bartenschlager und Schaller 1992, Seifer et al. 1993, Hu und Seeger 1996). In diesen unreifen Kapsiden findet nun die reverse Transkription sowie die Zweitstrangsynthese statt (Summers und Mason 1982). Sobald die reverse Transkription abgeschlossen ist, wird ein Teil der nun reifen Kapside zurück zum Kern transportiert, was dort zur Erhöhung der cccDNA-Menge führt (Tuttleman et al. 1986, Wu et al. 1990).

Der andere Teil der reifen Kapside wird mit in die ER-Membran eingebetteten Oberflächenproteinen umhüllt und über multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*) aus der Zelle ausgeschleust (Lambert et al. 2007). Der Großteil der Oberflächenproteine wird jedoch über das ER und den Golgi-Apparat als subvirale Partikel sekretiert (Huovila et al. 1992, Patient et al. 2007).

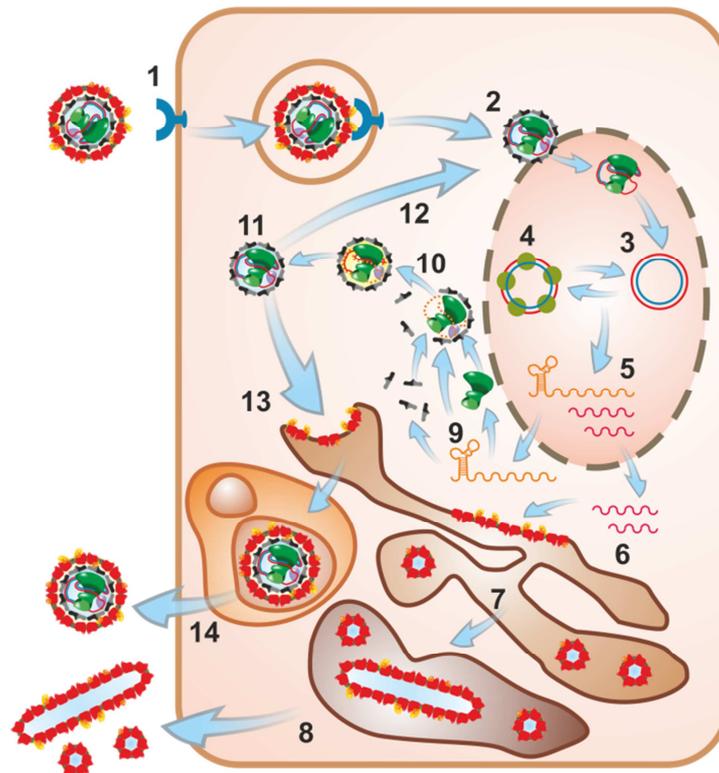


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus. 1) Bindung und Aufnahme des Virus, 2) Virus wird aus dem Endosom entlassen und das virale Core-Partikel zum Zellkern transportiert, 3) das Genom wird in den Zellkern entlassen und in cccDNA umgewandelt, 4) cccDNA liegt im Zellkern als Minichromosom vor, 5) cccDNA wird in pgRNA und mRNAs transkribiert, 6) Translation der mRNAs in die Oberflächenproteine am ER, 7) Bildung der subviralen Partikel 8) Konstitutive Sekretion der subviralen Partikel über den Golgi-Apparat, 9) Translation der pgRNA in die Polymerase und Core-Proteine. 10) Verpackung der pgRNA und der viralen Polymerase durch Core-Proteine, 11) Kapsidreifung durch reverse Transkription und DNA-Zweitstrangsynthese, 12) Rücktransport der Kapside zum Kern, 13) Verpackung der Kapside mit Oberflächenproteinen, 14) Ausschleusung über multivesikuläre Körperchen. Abbildung verändert nach Glebe und Bremer (2013).

1.2 Hepatitis B als Infektionskrankheit

1.2.1 Epidemiologie und Infektionsverlauf

Die Hepatitis B ist eine lebensbedrohliche Infektion der Leber. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt es ca. 240 Mio. chronisch infizierte Menschen weltweit (WHO 2013). Ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung hat serologische Anzeichen einer überstandenen oder vorhandenen HBV-Infektion (EASL 2012). Jedes Jahr sterben geschätzt ca. 600.000 Menschen an den Folgen einer akuten oder chronischen Erkrankung. Damit gehört die Hepatitis B zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit (WHO 2013).

Laut den aktuellen Zahlen der WHO ist die Prävalenz der Hepatitis B mit 5 – 10 % chronisch infizierten Erwachsenen in den subsaharischen Ländern Afrikas (südlich der Sahara) und Ostasien am höchsten. Die Infektion findet in Subsahara-Afrika meistens in der Kindheit und in Ostasien überwiegend während der Geburt statt. Im mittleren Osten und auf dem indischen Subkontinent sind geschätzte 2 – 5 % chronisch infiziert. In Nordamerika und Westeuropa trifft dies für weniger als 1 % der Bevölkerung zu (WHO 2013).

Eine HBV-Infektion kann parenteral, perinatal und sexuell erfolgen, wobei die perinatale Infektion besonders in hoch endemischen Gebieten sehr häufig ist. Schon geringste Mengen Blut (1 nl) eines hoch

virämischen Virusträgers mit bis zu 10^{10} Viren/ml Blut können für eine Infektion ausreichend sein (Lavanchy 2004). Das Virus kann auch nach einer Woche außerhalb des Körpers noch infektiös sein (WHO 2013). Die Inkubationszeit beträgt 30 bis 180 Tage (WHO 2013). Die Infektion mit einer geringen Dosis verläuft meist inapparent und zieht eine anschließende Immunität nach sich. Erfolgt die Infektion mit einer höheren Dosis, hat dies meist einen akuten Infektionsverlauf zur Folge. Typische Symptome sind die Gelbverfärbung der Haut und der Augen (Gelbsucht), dunkler Urin, extreme Müdigkeit, Schmerzen im Oberbauch und Übelkeit mit Erbrechen. Die Symptome dauern meist mehrere Wochen an. Die akute Hepatitis B heilt jedoch bei ansonsten gesunden Erwachsenen in mehr als 90 % der Fälle innerhalb eines halben Jahres vollständig aus (WHO 2013). Selten kommt es zur fulminanten Hepatitis, die unbehandelt in 70 % der Fälle zum Tod führt (Schäfer et al. 2009). Seit 1982 ist eine Impfung verfügbar, die in über 90 % der Fälle zu einem wirksamen Schutz vor einer Infektion führt (Lavanchy 2004).

Die Chronifizierung ist abhängig vom Alter und dem Immunstatus des Infizierten. Weniger als 5 % der infizierten immunkompetenten Erwachsenen entwickeln eine chronische Infektion. Fand die Infektion jedoch vor dem sechsten Lebensjahr statt, steigt die Chronifizierungsrate auf bis zu 90 % an (Ganem und Prince 2004, WHO 2013). Eine chronische Hepatitis B liegt bei einem Nachweis von HBsAg über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten vor. Bekannte Folgeerkrankungen der chronischen Hepatitis B sind die Leberzirrhose und das Leberzellkarzinom. Das Hepatitis-B-Virus ist damit die fünft häufigste Krebsursache der Welt (Lavanchy 2005).

1.2.2 Therapie

Eine akute Hepatitis B Infektion muss im Normalfall nicht therapiert werden, da die meisten Fälle von alleine ausheilen. Bei einem fulminanten Krankheitsverlauf kann dagegen die frühzeitige Gabe von Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase vorteilhaft sein (Yu et al. 2010). Liegt jedoch eine chronische HBV-Infektion vor, erhöht sich das Risiko an einer Leberzirrhose und einem Leberzellkarzinom zu erkranken in den Folgejahren beträchtlich. Dabei ist das Risiko eine dieser Folgeerkrankungen zu erleiden direkt von der Höhe der individuellen Viruslast der einzelnen Patienten abhängig (Beasley et al. 1981, Arbuthnot und Kew 2001, Block et al. 2003, Cougot et al. 2005, Chen et al. 2006, Iloeje et al. 2006). In der REVEAL-Studie wurde die kumulative Inzidenz einer Leberzirrhose in Abhängigkeit des Virustiters (ermittelt als virale Genomäquivalente pro ml Serum, GE/ml) über einen Zeitraum von 13 Jahren untersucht (Iloeje et al. 2006). In der Patientengruppe mit einem Titer von mehr als 10^6 GE/ml erkrankten siebenmal mehr chronisch Infizierte an einer Leberzirrhose als in der Gruppe mit einem Titer von weniger als 300 GE/ml. (Abbildung 1.4). Ziel der Therapie ist es daher die Viruslast sowie das ALT-Level (Alanin-Aminotransferase, ein Marker für eine Leberfunktionsstörung) im Blut der Patienten möglichst weit zu senken und im optimalen Fall eine HBeAg-Serokonversion zu erreichen (EASL 2012).

Für die Therapie stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Interferon α und Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase. Interferon α kann für die Therapie in der herkömmlichen Form für sechs Wochen oder in der pegylierten Form für 48 Wochen gegeben werden. Es stimuliert das Immunsystem und trägt so zur Kontrolle der Infektion bei. Bei etwa 40 % der Patienten führt die Therapie zur HBeAg-Serokonversion und zu einer deutlichen Verringerung der Viruslast. Bei einem kleinen Teil kommt es sogar zur HBs-Serokonversion und der kompletten Unterdrückung der Virämie (Perrillo et al. 1990, Wong et al. 1993). Die Therapie kann jedoch zu starken Nebenwirkungen wie Depressionen, grippeähnlichen Symptomen, Leukopenie und Haarverlust führen, daher sollte in jedem Fall das Ansprechen auf die

Therapie verfolgt werden (Perrillo et al. 1990). Die Therapie mit Interferon α ist besonders gut geeignet für HBeAg-positive Patienten mit hohem ALT-Level. Der Therapieerfolg ist außerdem auch vom Genotyp des Virus abhängig. So konnte gezeigt werden, dass sich eine Interferontherapie gut für einer Infektion mit den Genotypen A und B, jedoch weniger gut für eine Infektion mit den Genotypen C und D eignet (Perrillo 2009).

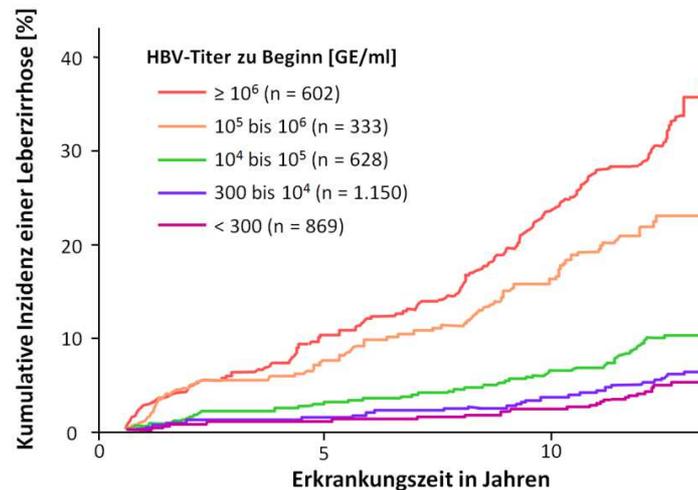


Abbildung 1.4: Abhängigkeit der Inzidenz einer Leberzirrhose von der Viruslast bei einer chronischen Hepatitis B Infektion. Es wurden 3.582 Patienten über einen durchschnittlichen Zeitraum von elf Jahren beobachtet. Für die Darstellung wurden die Patienten nach ihrem HBV-Titer zu Beginn der Infektion in fünf Gruppen eingeteilt. Dargestellt ist die kumulative Inzidenz einer Leberzirrhose in % in Abhängigkeit der Erkrankungszeit in Jahren. Abbildung verändert nach Iloeje et al. (2006).

Kommt eine Therapie mit Interferon α nicht in Frage oder war diese nicht erfolgreich, bleibt nur noch die Therapie mit Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase. Dabei handelt es sich um Nukleosid- und Nukleotidanaloga. Sie kompetieren mit den natürlichen Nukleotidtriphosphaten als Substrat der viralen Polymerase und führen letztendlich zum Kettenabbruch des neu synthetisierten DNA-Strangs. Die Therapie mit Nukleos(t)idanaloga verursacht meist nur wenige Nebenwirkungen, da die virale Polymerase relativ spezifisch inhibiert wird. Die bereits in den infizierten Zellen vorhandenen viralen cccDNAs werden jedoch nicht direkt beeinflusst. Die Therapie muss daher meist lebenslang erfolgen, da es ansonsten ausgehend von den cccDNAs in den infizierten Zellen zu einer raschen Reaktivierung des Virus und damit zu einem Anstieg der Viruslast kommen würde (Zoulim und Locarnini 2009).

Tabelle 1.1: Vor- und Nachteile der Therapie mit Interferon α und Nukleos(t)idanaloga. Tabelle verändert nach EASL (2012).

	Interferon α	Nukleos(t)idanaloga
Vorteile	begrenzte Behandlungsdauer keine Resistenzentwicklung mehr HBe- und HBc-Serokonversion	starker antiviraler Effekt gute Verträglichkeit orale Einnahme
Nachteile	moderater antiviraler Effekt schlechtere Verträglichkeit Risiko von Nebenwirkungen subkutane Injektionen nötig nur bei einem Teil der Patienten erfolgreich	lebenslange Therapie notwendig Risiko der Resistenzentwicklung Risiko von Spätfolgen unbekannt Risiko von Nebenwirkungen

Zurzeit gibt es fünf für die HBV-Therapie zugelassene Nukleos(t)idanaloga (Abbildung 1.5). Das sind die Nukleosidanaloga Lamivudin, Telbivudin und Entecavir und die Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir (Zoulim und Locarnini 2013). Lamivudin wurde ursprünglich für die HIV-Therapie entwickelt und als erstes auch für die Therapie von HBV zugelassen (Ghany und Liang 2007). Es ist ein Analog des Cytidins bei dem das 3'-Kohlenstoffatom der Ribose durch ein Schwefelatom ersetzt wurde. Dadurch kommt es zum Verlust der für die Elongation nötigen Hydroxylgruppe (Severini et al. 1995, Ghany und Liang 2007). Telbivudin ist das L-Enantiomer des Thymidins, es hat aufgrund seiner ausgeprägten Kreuzresistenz zu Lamivudin nur eine geringe klinische Bedeutung (Ghany und Liang 2007). Entecavir ist ein Analog des Guanosins und wurde als Medikament gegen Herpes entwickelt. Es gehört zur Klasse der Cyclopentane, wobei das Sauerstoffatom der Furanose durch ein Kohlenstoffatom mit einer Methylseitentengruppe ersetzt ist (Innaimo et al. 1997). Nach dem Einbau in den DNA-Strang ist die Elongation energetisch und sterisch so weit beschränkt, dass es zum Kettenabbruch kommt (Langley et al. 2007). Entecavir ist im Moment das potenteste antivirale Medikament gegen HBV, seine IC_{50} ist im Vergleich zu Lamivudin 100-fach geringer (Shaw und Locarnini 2004, Ghany und Liang 2007). Bei den beiden Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir handelt es sich um azyklische Posphonate, die dem Adenosin sehr ähnlich sind. Wie auch Lamivudin stammen sie aus der HIV-Therapie (Ghany und Liang 2007). Auch ihnen fehlt die Hydroxylgruppe für die Elongation, sodass es nach dem Einbau in den DNA-Strang zum Kettenabbruch kommt. Das erst vor einigen Jahren für die HBV-Therapie zugelassene Tenofovir unterscheidet sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe vom Adefovir. Diese kleine Änderung führt jedoch zu einer deutlich geringeren Nephrotoxizität, sodass Tenofovir in einer höheren Dosis verabreicht werden kann (Reynaud et al. 2009).

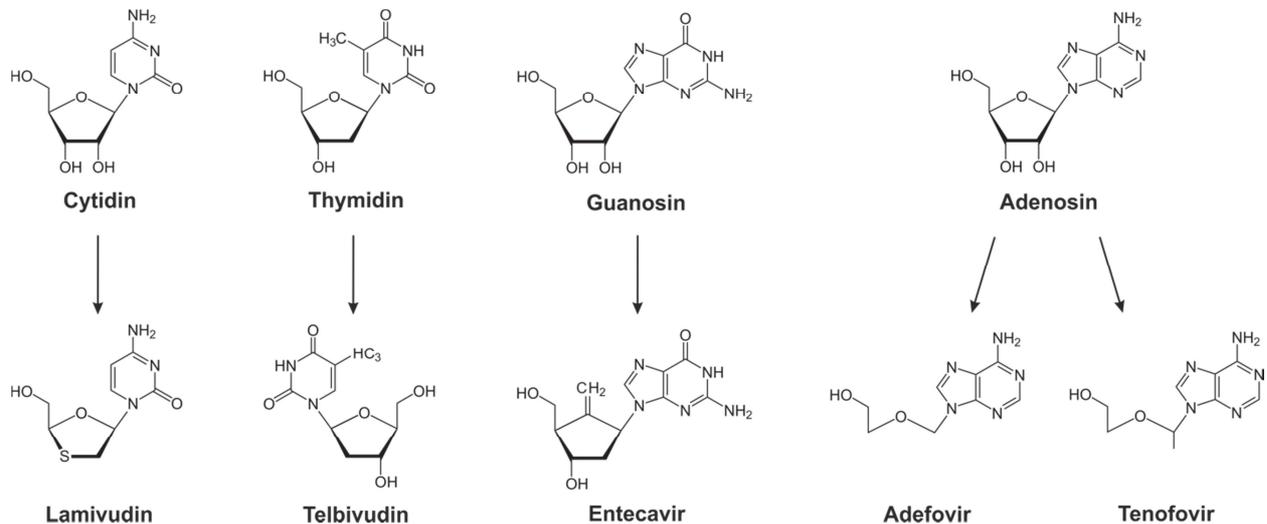


Abbildung 1.5: Für die HBV-Therapie zugelassene Nukleos(t)idanaloga. Dargestellt sind die Strukturformeln der Nukleos(t)ide mit ihren Analoga.

1.2.3 Entwicklung der Resistenz gegen Nukleos(t)idanaloga

Bei der Therapie mit Nukleos(t)idanaloga stellt die Entwicklung von Resistenzen ein ernstzunehmendes Problem dar. Eine Resistenz entsteht auf der Grundlage einer Mutation im Polymerasegen des HBV-Genoms. Es kommt in Anwesenheit des antiviral wirkenden Medikaments zum Anstieg des Virustiters und zeitlich versetzt auch zum Anstieg des ALT-Levels. Man spricht von einer Resistenz wenn der Titer um den Faktor 10 angestiegen ist. Wird die Behandlung nicht angepasst, steigt in der Folge das

Risiko an einer der HBV-typischen Folgeerkrankungen (Leberzirrhose und Leberzellkarzinom) zu erkranken (Zoulim und Locarnini 2013).

Die Entstehung von viralen Resistenzmutationen wird durch die starke Replikation des HBV mit bis zu 10^{11} neuen Viren pro Tag in einem chronisch infizierten Patienten sehr begünstigt (Nowak et al. 1996). Außerdem besitzen weder die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II noch die virale Polymerase/Reverse Transkriptase eine Fehlerkorrekturfunktion. Aufgrund dessen ist die Mutationsrate je Replikationszyklus mit 10^{-5} Fehlern pro Basenpaar (bp) sehr hoch (Girones und Miller 1989). Daraus folgt, dass jede Base des ca. 3,2 kb großen HBV-Genoms jeden Tag bis zu 1.000-mal mutiert werden kann. Es entstehen also jeden Tag Tausende neue HBV-Mutanten. Diese bilden einen Pool aus unterschiedlichen Quasispezies, die als cccDNA in den Leberzellen „archiviert“ wird. Das Ziel der Therapie ist es daher die Viruslast möglichst schnell massiv zu senken. Denn je höher die Viruslast ist, desto höher ist auch die Mutationsrate. Damit einher geht eine schnelle Entwicklung von Resistenzen (Zoulim und Locarnini 2013).

Die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Nukleos(t)idanaloga (Abbildung 1.6). Bei den Patienten einer Studie war die Wahrscheinlichkeit innerhalb von fünf Jahren eine Lamivudin- oder Adefovirresistenz zu entwickeln mit etwa 80 bzw. 29 % relativ hoch. Bei der Therapie mit Entecavir kam es dagegen nur bei etwa 1 % der Patienten zur Entstehung einer Resistenz. Allerdings eignet sich Entecavir nicht für die Therapie von Patienten mit einer bereits vorhandenen Lamivudinresistenz. In bereits mit Lamivudin behandelten Patienten entwickelte sich zu 51 % innerhalb von fünf Jahren ebenfalls eine Entecavirresistenz. Eine Resistenzentwicklung gegen Tenofovir wurde in vivo bisher noch nicht beobachtet. Allerdings ist Tenofovir auch das zuletzt für die HBV-Therapie zugelassene Medikament, sodass hier noch weniger Erfahrungen vorhanden sind (Zoulim und Locarnini 2009, 2013).

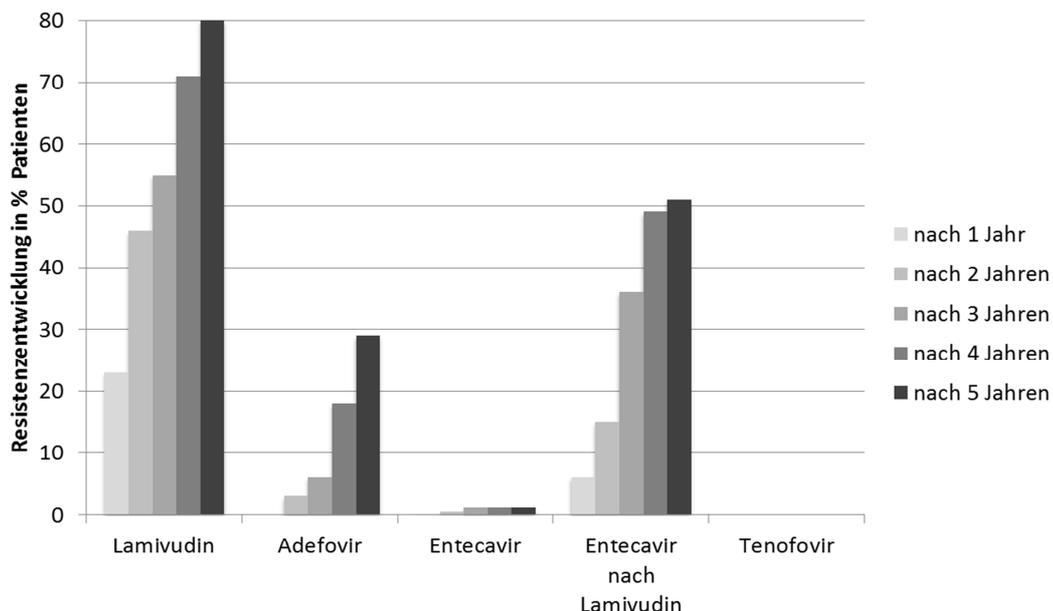


Abbildung 1.6: Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung bei der Therapie mit Nukleos(t)idanaloga. Gezeigt ist die Zahl der resistenten Patienten in % nach ein bis fünf Jahren Therapie mit Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Tenofovir und der Therapie mit Entecavir von Lamivudin-resistenten Patienten. Daten aus Zoulim und Locarnini (2009).

Bei den Resistenzmutationen unterscheidet man zwischen Primärmutationen, die für die Resistenz gegenüber der Reversen Transkriptase verantwortlich sind und den Sekundärmutationen. Diese werden auch kompensatorische Mutationen genannt, da sie die für das Virus nachteiligen Effekte der Primärmutationen ausgleichen. Sie erhöhen zum Beispiel die herabgesetzte Replikationsfähigkeit des Virus (Zoulim und Locarnini 2013). Tabelle 1.2 zeigt einen Überblick über die wichtigsten bisher mit der Resistenz assoziierten Mutationen.

Tabelle 1.2: Übersicht über die primären Resistenzmutationen. Die Resistenzen gegen die Nukleotidanaloga Lamivudin (LMV) und Entecavir (ETV) sowie die Nukleotidanaloga Adefovir (ADV) und Tenofovir (TDF) sind in starke Resistenz (rot), intermediäre Resistenz (orange) und keine Resistenz (grün) eingeteilt.

Mutationen	LMV	ETV	ADV	TDF
rtM204I/V	●	●	●	●
rtL180M + rtM204I/V ± rtI169 ± rtT184 ± rtS202 ± rtM250	●	●	●	●
rtA181T/V	●	●	●	●
rtN236T	●	●	●	●
rtA181T/V + rtN236T	●	●	●	●

Die bedeutendsten Primärmutationen für eine Lamivudinresistenz sind im katalytischen Zentrum der Reversen Transkriptase zu finden (YMDD-Motiv). Es handelt sich dabei um den Austausch des Methionins an Position 204 zu Valin oder Isoleucin (Stuyver et al. 2001). Die Mutation rtM204V tritt fast ausschließlich zusammen mit mindestens einer Sekundärmutation auf, meistens ist dies die rtL180M. Die Mutation rtM204I wurde dagegen häufiger auch alleine gefunden (Delaney et al. 2001, Shaw et al. 2006). Weitere Sekundärmutationen sind zum Beispiel rtL80I/V (Ogata et al. 1999) und rtV173L (Delaney et al. 2003). Neben den Mutationen rtM204I/V verursachen auch die Mutationen rtA181T/V eine Lamivudinresistenz. Sie verursachen *in vitro* jedoch eine im Vergleich zu den Mutationen rtM204I/V deutlich schwächere Resistenz und sind auch in der Klinik weniger bedeutsam. Allerdings verursachen sie dafür eine Kreuzresistenz gegen Adefovir und Tenofovir (Shaw et al. 2006, Villet et al. 2008).

Eine Entecavirresistenz entwickelt sich immer auf der Grundlage der Lamivudinresistenzmutationen rtL180M und rtM204I/V. Für eine klinisch relevante Resistenz wird zusätzlich mindestens eine der Mutationen rtI169T, rtS184A/G, rtS202G/I oder rtM250V bzw. eine Kombination aus diesen benötigt. Die Mutation rtM250V verursacht auch alleine eine geringe Resistenz gegen Entecavir (Tenney et al. 2004).

Eine Resistenz gegen Adefovir wird von den Mutationen rtA181T/V und rtN236T verursacht (Angus et al. 2003, Fung et al. 2005). Da sich Adefovir und Tenofovir ihrer Struktur sehr ähnlich sind, verursachen die erwähnten Mutationen ebenfalls ein vermindertes Ansprechen auf Tenofovir (Lok et al. 2007, van Bömmel et al. 2010, Patterson et al. 2011). Tenofovir kann jedoch aufgrund seiner geringeren Nephrotoxizität in einer höheren Dosis verwendet werden. Wahrscheinlich spielt die *in vitro* festgestellte Resistenz gegen Tenofovir daher *in vivo* nur eine geringe Rolle (Kitrinos et al. 2013).

1.2.4 Resistenzbestimmung

Die Therapie mit Nukleos(t)idanaloga ist meist die letzte Behandlungsmöglichkeit für chronisch HBV-Infizierte. Gerade deswegen ist es enorm wichtig die Therapie von Anfang an möglichst optimal zu gestalten und so das Risiko einer Resistenzentwicklung zu minimieren. Das Verständnis der viralen Mutationsmuster und vor allem auch das der Kreuzresistenzen spielt daher eine sehr wichtige Rolle.

Um dieses Verständnis voran zu treiben und besonders auch um die bereits im Patienten vorhandenen Resistenzmutationen vor und während der Therapie festzustellen, bietet sich die genotypische Charakterisierung der Quasispezies an. Hierfür muss das Genom komplett oder teilweise PCR-basiert amplifiziert werden. Anschließend können verschiedene Methoden wie die Sequenzierung, die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP), der *Line Probe Assay* (LPA) oder auch DNA-Chips zur Anwendung kommen. Mit diesen Methoden können jedoch nur bereits bekannte Mutationen beurteilt werden und eine quantitative Aussage über die Resistenz ist ebenfalls nicht möglich (Bartholomeusz und Schaefer 2004).

Die phänotypische Analyse einzelner HBV-Mutanten ermöglicht sowohl die Quantifizierung der Resistenz als auch die Entdeckung neuer Resistenzmuster und ist damit der reinen Genotypisierung deutlich überlegen. Der Nachteil dieser Methode ist der höhere zeitliche und finanzielle Aufwand. Das Genom muss in einer replikationsfähigen Form vorliegen und anschließend in eine Hepatomzelllinie eingebracht werden. So kann die Replikation der Mutante in Abhängigkeit eines Nukleos(t)analogons im Vergleich zu einem Wildtypvirus bestimmt werden. Der Unterschied in der Replikationsstärke ist dabei ein Maß für die Resistenz. Es existieren phänotypische Assays, die ohne die Nutzung eines Vektors auskommen, aber auch Methoden bei denen das HBV-Genom als Überlängenkonstrukt in einen Expressionsvektor kloniert wird. Hierbei kann die Expression unter dem natürlichen HBV-Promotor (1.3- bis 2.0-fache Überlängenkonstrukte) oder aber unter einem starken heterologen Promotor (1.1-fache Überlängenkonstrukte) stehen. Wurde die Replikation früher noch mit Southern Blots quantifiziert, so kommen heute meistens quantitative realtime PCRs zum Einsatz (Durantel et al. 2005).

1.3 Ziel der Arbeit

Der in der Arbeitsgruppe von PD Dr. D. Glebe im Rahmen des HOPE-Projekts (**H**epatitis B Therapie: **O**ptimierung durch **p**hänotypische **E**valuation) am Institut für Medizinische Virologie bereits etablierte phänotypische Assay zur Resistenzbestimmung von HBV-Mutanten gegen Nukleos(t)idanaloga sollte zur Charakterisierung von weiteren speziellen HBV-Varianten aus der klinischen Praxis genutzt werden.

Ein entscheidender limitierender Faktor des Assays ist die oft sehr niedrige Replikationsfähigkeit der zu testenden HBV-Mutanten, sodass viele Isolate aufgrund ihrer zu geringen Replikation nicht phänotypisch charakterisiert werden konnten. Daher sollte die Methodik des Assays dahingehend optimiert werden.

Außerdem sollte versucht werden, weniger artifizielle HBV-exprimierende Plasmide für die Phänotypisierung zu verwenden. Hierzu sollte die Klonierungsmethode so angepasst werden, dass die HBV-Konstrukte vollständig unter der Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren stehen (1.5-fache Überlängenkonstrukte). Für den Nachweis der viralen Replikation dieser Überlängenkonstrukte sollte außerdem eine neue quantitative PCR etabliert werden.

Im Rahmen des HOPE-Projekts wurde bereits zuvor ein multiresistentes HBV-Isolat mit außergewöhnlich hohen Adefovir- und Tenofovirresistenzen gefunden. Der optimierte phänotypische Assay sollte genutzt werden um das Isolat zusammen mit weiteren HBV-Varianten aus dem gleichen Patienten im Rahmen dieser Arbeit weitergehend genotypisch und phänotypisch zu charakterisieren. Das Ziel dieser Charakterisierung war es, eine Erklärung für das besondere Resistenzprofil zu finden.

2 Material und Methoden

Einige Abschnitte dieses Kapitels wurden bereits in der Dissertation von Dr. Andreas Geipel (2011) und der Masterarbeit von Pia Seiz (2011) beschrieben.

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurden sämtliche Puffer und Lösungen mit H₂O angesetzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung	Hersteller
1x TAE	2 % (v/v) 50x TAE	
2x SEAP-Puffer	2 M Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ 20 mM L-Homoarginin	
50x TAE		Applichem (Darmstadt) Kat.-Nr.: A1691,1000
6x Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau in 1x TAE	
Methylenblaulösung	0,02 % (w/v) Methylenblau	
PBS	83,0 mM NaCl, 8,6 mM KCl 10,0 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄	
PBS++	1 % (v/v) PBS++ Stammlösung in PBS	
PBS++ Stammlösung	0,90 mM CaCl ₂ 0,52 mM MgCl ₂ 0,16 mM MgSO ₄	
SEAP-Substrat	50 nM pNitrophenylphosphat	
Trypsin/EDTA-Lösung	10 % (v/v) Trypsin/EDTA in PBS	Life Technologies (Darmstadt) Kat.-Nr.: 15400-054

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin und Carbenicillin wurde in H₂O angesetzt, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

Name	Stammkonz.	Arbeitskonz.	Hersteller
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	
Carbenicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	
Penicillin/Streptomycin	100x	1x	PAA (Pasching), Kat.-Nr.: P11-010

2.1.3 Medien

Das LB-Medium wurde bei 21 °C und 1 bar Überdruck für 20 min im Autoklav VX-150 der Firma Systec sterilisiert. Zur Selektion wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 60 °C Ampicillin oder Carbenicillin (2.1.2) zugesetzt. Die Medien für die Zellkultur wurden als fertiges Flüssigmedium gekauft und mussten nur noch mit den in Tabelle 2.3 angegebenen Zusätzen versetzt werden.

Tabelle 2.3: Verwendete Medien

Name	Zusammensetzung	Hersteller
	DMEM	Life Technologies (Darmstadt), Kat.-Nr.: 41966-029
DMEM mit Phenolrot	2 - 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching), Kat.-Nr.: A15-101 PAA (Pasching), Kat.-Nr.: P11-010
DMEM ohne alles	DMEM	Life Technologies (Darmstadt), Kat.-Nr.: 21063-029
	DMEM	Life Technologies (Darmstadt), Kat.-Nr.: 21063-029
DMEM ohne Phenolrot	2 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 mM Pyruvat	PAA (Pasching), Kat.-Nr.: A15-101 PAA (Pasching), Kat.-Nr.: P11-010 PAA (Pasching), Kat.-Nr.: S11-003
LB-Medium (fest)	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,0 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar	
LB-Medium (flüssig)	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,0 % (w/v) NaCl	
SOC-Medium		Clontech (Saint-Germain-en-Laye), Kat.-Nr.: 636763

2.1.4 Nukleosid- und Nukleotidanaloga

Die Nukleosid- und Nukleotidanaloga wurden in H₂O gelöst, sterilfiltriert und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Das restliche Pulver wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Verwendete Nukleosid- und Nukleotidanaloga

Name	Stammkonzentration	Hersteller
Adefovir	2 mM	Sequoia (Pangbourne), Kat.-Nr.: SRP02644a Sigma Aldrich (St. Louis), Kat.-Nr.: SML0240
Entecavir	1 nM	Sequoia (Pangbourne), Kat.-Nr.: SRP010887e
Lamivudin	10 mM	Sequoia (Pangbourne), Kat.-Nr.: SRP011251
Tenofovir	2 mM	Sequoia (Pangbourne), Kat.-Nr.: SRP01194t

2.1.5 Enzyme und Kits

Tabelle 2.5: Verwendete Enzyme und Kits

Name	Hersteller
Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: AB-4166
Absolute QPCR Capillary Mix	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: AB-1283
dNTP Mix	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: R0199
DpnI	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: ER1705
dsDNase	ArcticZymes (Tromsø), Kat.-Nr.: 70600-201
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega (Mannheim), Kat.-Nr.: E2312
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim), Kat.-Nr.: M8301
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche (Penzberg), Kat.-Nr.: 11858874001
In-Fusion HD Cloning System	Clontech (Saint-Germain-en-Laye), Kat.-Nr.: 639643
innuPREP Gel Extraction Kit	Analytik Jena (Jena), Kat.-Nr.: 845-KS-5030250
innuPREP PCRpure Kit	Analytik Jena (Jena), Kat.-Nr.: 845-KS-5010250
innuPREP Plasmid Mini Kit Plus	Analytik Jena (Jena), Kat.-Nr.: 845-KS-5240250
InviMag Virus DNA/RNA Mini Kit	Stratec (Birkenfeld), Kat.-Nr.: 1440100300
KpnI-HF	NEB (Ipswich), Kat.-Nr.: R3142S
PfuTurbo DNA Polymerase	Agilent Technologies (Böblingen), Kat.-Nr.: 600250
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: F530s
Proteinase K	Abbott Laboratories (Illinois), Kat.-Nr.: 3L78-60
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen (Hilden), Kat.-Nr.: 12943
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden), Kat.-Nr.: 27104
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden), Kat.-Nr.: 28704
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden), Kat.-Nr.: 28104
Sample Preparation System DNA	Abbott Laboratories (Illinois), Kat.-Nr.: 06K12-24
T4 DNA Ligase	Fisher Scientific (Schwerte), Kat.-Nr.: EL0011

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG (Ebersberg), metabion (Martensried) und biomers.net (Ulm) synthetisiert. Die Primersequenzen können den folgenden nach Anwendung sortierten Tabellen entnommen werden.

Tabelle 2.6: Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5' - 3' Orientierung)
150erPrimer-F	TATTTGGTGTCTTTCCGGAGTGT
150erPrimer-R	GTCGGGAAAGAATCCCAG
150erRT-F	GGCTCCAGTTCAGGAACAG
150erRT-R	AGCCAGAAAGGTTCCACG
AD15-1-as	CTGAGTGCAGTATGGTGAGG
AGD15-2-as	TGAGTCCAAGGAATACTAAC
AGD15-3-as	CTGCATGGCCTGAGGATG
AGD15-4neu-s	AGGTATGTTGCCCGTTTG
AGD15-4-s	GAAATTGCACCTGTATTCCC
AGD15-5-as	CGAACCCTGAACAAATGGC
AGD15-6-s	ACATGGAGAACATCACATCAG
CMV-antisense	GAGCTCTGCTTATATAGACC
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
CMV-sense	ATAGCGGTTTGACTCACG
G15-1-as	CAATGATCAGAGGACTCTAAGG
pCEP-ohneCMV-fw	GCTATTGGCCATTGCATACG
pCEP-ohneCMVneu-fw	TGTCCTCATAAACCCCTAACCTC
pCEP-Puro-reverse	AGCTGCATGTGTCAGAGG
pCH9-200-forward	AAATGTCGTAACAACCTCCGC
pCH9-200-reverse	ACACATACGATTTAGGTGACAC
POL-sense	ACTCCTCCAGCTTATAGACC
PreS1-sense	GTCACCATATTCTTGGGAAC
Primer-antisense	GTTCCCARGWATATGGTGAC
Primer-sense	CTATCYTATCMACACTTCCGG
S4as-sense	TTACCAATTTTCTTTTGTC
S6-sense	TGGATGTGTCTGCGGC
vorSV40reverse	ATGTCTGGATCCGGCCTTGC
X1-antisense	GCGTTCACGGTGGTCTCCATGC
X1-sense	TACGTCCCCTCGGCGCTGAATCC
X2-sense	GACGTCCTTTGTYTACGTCCCCTC
X3-sense	TTTGTTTACGTCCCCTCG

Tabelle 2.7: Primer und Sonden für die quantitative PCR

Name	Sequenz (5' - 3' Orientierung)
dsDNase-fw	CATACTGCGGAACCTCCTAGC
dsDNase-rev	GGGACGTAAACAAAGGACG
HOPE Ke-Forward	ACTAGGAGGCTGTAGGCATA
HOPE Ke-Reverse	AGACTCTAAGGCTTCCCG
X2-antisense	TGCAGAGGTGAAGCGAAGTGCACA
X2-sense	GACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTC
X-sense-alt-DpnI	GGHTGTGCTGCCAACTGGATCC
X-Taqmansonde	Fam-CTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG-Tamra

Tabelle 2.8: Primer für die Klonierung

Name	Sequenz (5' - 3' Orientierung)
11-A-fw	ATAAGCAGAGCTCGTCGACGCACCATGCAACTTTTTTCACC
11-D-fw	TGGATGTGTCTGCGGC
11-I-rev	AGCAAGCTTGCTAGCGAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC
11-N-rev	CCGCAGACACATCCAGC
150erPrimer-F	TATTTGGTGTCTTTCCGGAGTGT
150erPrimer-R	GTCGGGAAAGAATCCAG
150erRT-F	GGCTCCAGTTCAGGAACAG
150erRT-R	AGCCAGAAAGGTTCCACG
15-A-fw	TGTCCAATATGACCGTCGACCTTTCCCCCACTGTYTGG
3091-Cloning-S-fw	CAATCTTCTCGAGGATTGGG
CEPU-30nt-fw	GCTAGCAAGCTTGCTAGCGG
CEPU-30nt-rev	ACGAGCTCTGCTTATATAGACCTCC
CEPU-ohneCMV-rev	CGGTCATATTGGACATGAGCC
Cloning-BB-Will-fw	ACCATGCAACTTTTTGAAGAGCTCAAGCTTCGCTAGCCCTATAGTGA GTCG
Cloning-BB-Will-rev	GGCAGAGGTGAAAAAGAAGAGCTCAAGCTTCTGCTTATATAGACCT CCCAC
gtA-11-A-fw	ATAAGCAGAGCTCGTCGACGCACCAATGCAACTTTTTTCACC
gtA-Will-P1-11-fw	TTTCACCTCTGCCTAACCATC
gtG-11-A-fw	ATAAGVAGAGCTCGTCGACGCACCATGTAAGTTTTTCACCTC
gtG-11-I-rev	AGCAAGCTTGCTAGCGACGGGAAAAAAGTCAGAAGG
gtG-Will-P2-11-rev	AAGTTACATGGTGCTGGTGC
HN06-A-fw	ATAAGCAGAGCTACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACC
HN06-Klon12-D-fw	TCGATGTGTCTGCGGC
HN06-Klon12-N-rev	CCGCAGACACATCGAGC
Pali-rev	GCAGCCGGATCATAATCAGC
Pol-Hope-Forward	GTCACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACG

Pol-Hope-Reverse	GCGCATCGGTCCGGCAGATGAGAAGGC
Primer-antisense	GTTCCCARGWATATGGTGAC
Primer-sense	CTATCYTATCMACACTTCCGG
Will1-xs	TTTTTCACCTCTGCCTAATCA
Will1-xs2	TTTTTCACCTCTGCCTAATCATCT
Will2-xs	AAAAAGTTGCATGGTGCTGG
Will2-xs2	AAAAAGTTGCATGGTGCTGG
Will-P1-11-fw	TTTCACCTCTGCCTAATCATC
Will-P2-11-rev	AAGTTGCATGGTGCTGG

Tabelle 2.9: Primer für die ortsspezifische Mutagenese

Name	Sequenz (5' - 3' Orientierung)
150-1 ohne T76S-fw	GTCTTTAACCTAATTGGAAAACACCCTCTTTTCC
150-1 ohne T76S-rev	GGAAAAGAGGGTGTTCCTCAATTAGGGTTAAAGAC
3091-L229F-fw	CGCTGTTACCAATTTTCTTTTCTTTGGGTATAC
3091-L229F-rev	GTATACCCAAAGAGAAAAGAAAATTGGTAACAGCG
3091-L229V-fw	CGCTGTTACCAATTTTCTTGTGTCTTTGGGTATAC
3091-L229V-rev	GTATACCCAAAGACACAAGAAAATTGGTAACAGCG
3091-S78T-fw	GTCCTCCAACCTTGACCTGGTTATCGCTG
3091-S78T-rev	CAGCGATAACCAGGTCAAAGTTGGAGGAC
3091-Y135S-fw	GACCTGCATGACTCCTGCTCAAGGAAC
3091-Y135S-rev	GTTCTTGAGCAGGAGTCATGCAGGTC
3091-Y135T-fw	CGGACCTGCATGACACCTGCTCAAGGAAC
3091-Y135T-rev	GTTCTTGAGCAGGTGTCATGCAGGTCCG
3091-309K-fw	ATGTGGTTSTCCTGCGTTGAAGCCTTTGTATGCATG
9091-309K-rev	CATGCATACAAAGGCTTCAACGCAGGATAACCACAT
FvB-164-7-rtA181V-fw	CCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTG
FvB-164-7-rtA181V-rev	CACTAGTAAACTGAGCCAGGAGAAACGGG
HN06Klon08-A1844C-as	GAAGATCCTGGAAGTAGAGGACAAACGG
HN06Klon08-A1844C-s	CCGTTTGTCTCTACTTCCAGGATCTTC
HN06Klon08-A2198C-as	CTTTTTGTTTTGTTAGGGGTAAATGTATACCCAAAG
HN06Klon08-A2198C-s	CTTTGGGTATACATTTAACCCTAACAAAACAAAAG
HN06-Klon12-D-fw	TCGATGTGTCTGCGGC
HN06-Klon12-N-rev	CCGCAGACACATCGAGC
HN19-A1874C-as	CAGGTTCTGCATGGTCCCCTGCTGGTG
HN19-A1874C-s	CACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTG
RK-117-3-rtA181V-fw	GTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTG
RK-117-3-rtA181V-rev	CACTAGTAAACTGAGCCAAGAGAAACGGAC
RK-117-3-rtS78T-fw	CTGTCTCCAATTTGACCTGGTTATCGCTG
RK-117-3-rtS78T-rev	CAGCGATAACCAGGTCAAATTGGAGGACAG

2.1.7 Längen- und Größenstandard

Um die Größe von DNA-Fragmenten im Agarosegel abzuschätzen, wurde der *1 Kb Plus DNA Ladder* von Life Technologies (Darmstadt) verwendet.

2.1.8 Plasmide

2.1.8.1 pCEP-Puro

Das Plasmid pCEP-Puro (Abbildung 2.1) wurde von Dr. A. Geipel (2011) auf Grundlage des pCEP4 der Firma Life Technologies (Darmstadt) und des pPur der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye) erstellt. Wie das Plasmid pCH9-3091 besitzt es einen CMV-Promotor. Zur Selektion und Vermehrung enthält es ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen sowie einen Replikationsursprung für *E. coli*. Außerdem enthält es ein Puromycinresistenzgen für die Selektion in Eukaryoten sowie das EBNA-1 Gen und den Ori-P des Epstein-Barr-Virus, um stabile Zelllinien mit episomalem Plasmid erzeugen zu können. Das Plasmid diente als Klonierungskassette für die erstellten 1.1- und 1.5-fachen Überlängenkonstrukte. Wobei für die 1.5-fachen Überlängenkonstrukte der CMV-Promotor entfernt wurde.

Der unter anderem als Wildtyp für den phänotypischen Assay verwendete pCEP-Puro-3091-1.1 trägt als Insert zwischen CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal das 1.1-fache Überlängenkonstrukt des Plasmids pCH9-3091 (2.1.8.2) und wurde freundlicherweise von Dr. A. Geipel zur Verfügung gestellt.

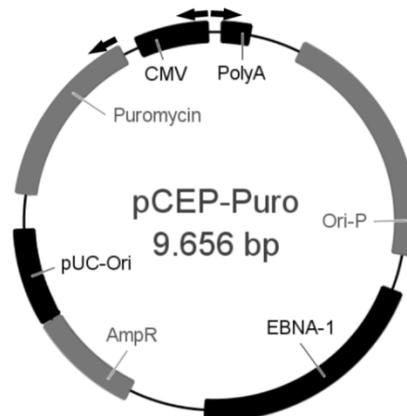


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pCEP-Puro. Es enthält einen CMV-Promotor (CMV), ein Polyadenylierungssignal (PolyA), ein Ampicillinresistenzgen (AmpR), einen Replikationsursprung für *E. Coli* (ColE1), ein Puromycinresistenzgen (Puromycin) sowie das EBNA-1 Gen und den OriP des Epstein-Barr-Virus. Die Primer für die Klonierung der Überlängenkonstrukte sind als schwarze Pfeile dargestellt (von links: CEPU-ohneCMV-rev, CEPU-30nt-rev und CEPU-30nt-fw).

2.1.8.2 pCH9-3031

Das Plasmid pCH9-3091 (Abbildung 2.2) enthält ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt eines HBV-Genoms des Genotyp D und einen vorgeschalteten CMV-Promotor (Nassal 1992). Aufgrund der Überlänge des Konstruktes wird die virale Replikation ermöglicht. Außerdem enthält es ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion sowie einen Replikationsursprung für *E. coli*. Das Plasmid wurde im Rahmen des HOPE-Projekts als Wildtyp und als Klonierungskassette für den phänotypischen Assay verwendet. Es wurde freundlicherweise von Prof. U. Protzer (TU München) zur Verfügung gestellt.

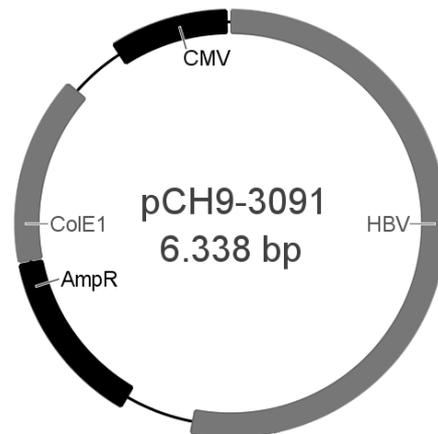


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des im Rahmen des HOPE-Projekts verwendeten Wildtypkonstrukts pCH9-3091. Es enthält ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt eines HBV-Genoms (HBV) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (CMV) sowie ein Ampicillinresistenzgen (AmpR) und einen Replikationsursprung für *E. coli* (ColE1).

2.1.8.3 pCH9-200

Das Plasmid pCH9-200 entspricht dem pCH9-3091 (2.1.8.2). Es wurde lediglich das 1.1-fache Überlängenkonstrukt entfernt.

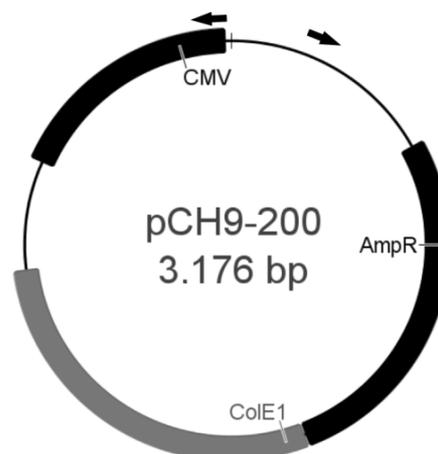


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pCH9-200. Es enthält einen CMV-Promotors (CMV), ein Ampicillinresistenzgen (AmpR) und einen Replikationsursprung für *E. Coli* (ColE1). Die Primer für die Ganzgenomklonierung sind als schwarze Pfeile dargestellt (links: Cloning-BB-Will-rev, rechts: Cloning-BB-Will-fw).

2.1.8.4 pSEAP2-Control

Das Plasmid pSEAP2-Control der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye) enthält ein Gen für die humane plazentale alkalische Phosphatase (SEAP), wobei dieser der Membrananker fehlt. Das SEAP-Gen steht unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Auch dieses Plasmid enthält für die Vermehrung ein Ampicillinresistenzgen sowie einen Replikationsursprung für *E. coli*.

2.1.9 HBV-Isolate des HOPE-Projekts

Alle im Rahmen dieser Arbeit phänotypisch charakterisierten HBV-Isolate des HOPE-Projekts wurden von Dr. M. Neuman-Fraune (Uniklinik Köln) in das Plasmid pCH9-3091 kloniert. Bei allen Isolaten wurde lediglich der Polymerase-ORF und nicht das HBV-Ganzgenom kloniert.

Tabelle 2.10: Im Rahmen des HOPE Projekts phänotypisierte HBV-Isolate aus Patientenseren

BW 103-2	BW 111-3	BW 125-2	MS 18-3	RK 22-15	RK 83-2	VS 2-12
BW 107-3	BW 113-1	FvB 170-3	MS 19-2	RK 22-20	VS 1-4	WH 2-16-1
BW 108-3	BW 113-5	FvB 84-2	RK 182-2	RK 266-1	VS 1-5	
BW 108-5	BW 121-5	MS 10-3	RK 194-5	RK 5-5	VS 2-10	

2.1.10 Humane Seren

Als Standard für die X-PCR sowie als HBV-DNA für die Etablierung der dsDNase-PCR wurde aufgereinigte DNA aus dem Serum ID382 der Serumdatabank des Instituts für Medizinische Virologie (Universität Gießen) verwendet. Die Seren des Patienten FvB 150-1 wurden freundlicherweise von Dr. F. van Bömmel (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt. Ein Ethikvotum für die verwendeten humanen Serumproben liegt vor.

2.1.11 Bakterienstamm

Für sämtliche Klonierungsarbeiten, die ortsspezifische Mutagenese sowie die Vermehrung von Plasmiden wurden *Stellar Competent Cells* der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye) verwendet. Sie sind Teil des *In-Fusion HD Cloning System* (2.1.5).

2.1.12 Zelllinien

2.1.12.1 HepG2

Bei den HepG2 Zellen handelt es sich um eine Hepatomzelllinie, die 1975 aus dem Biopsiematerial eines Hepatoblastoms gewonnen wurde. Sie zeichnen sich durch viele spezifische Leberzellfunktionen aus (Aden et al. 1979).

2.1.12.2 HuH7

Bei den HuH7 Zellen handelt es sich um eine Hepatomzelllinie, die aus einem hepatozellulären Karzinom eines Japaners gewonnen wurde (Nakabayashi et al. 1982).

2.1.12.3 HuH7-München

Bei den HuH7-München Zellen handelt es sich um einen speziellen Abkömmling der HuH7 Zellen. Bei dieser Zelllinie sollen die reifen Core-Partikel nicht mehr in den Zellkern reimportiert werden können (persönliche Mitteilung Prof. U. Protzer, TU München).

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium. Zur Selektion nach der Klonierung und der ortsspezifischen Mutagenese wurden die Bakterien mit einem sterilen Drigalskispatel auf Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Reagenzgläsern oder in Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 220 rpm ebenfalls über Nacht durchgeführt. Außer für die Herstellung von kompetenten Bakterien wurde dem Medium stets ein Antibiotikum zugesetzt.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden *Stellar Competent Cells* verwendet. In ein mit Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß wurden 1 µl des Plasmids oder 2 - 10 µl des Klonierungsansatzes vorgelegt. Zu der DNA wurden vorsichtig 45 µl kompetente Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 50 s bei 42 °C. Bevor dem Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugefügt wurden, erfolgte eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Der Transformationsansatz wurde dann für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert und anschließend auf Festmedium ausgestrichen und über Nacht inkubiert (2.2.1).

2.2.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

2.2.3.1 Minipräparation

Die Minipräparation von Plasmiden erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (2.1.5) oder dem *innuPREP Plasmid Mini Kit Plus*. Da auch das *innuPREP Plasmid Mini Kit Plus* stets nur mit 4 ml Ausgangsmaterial verwendet wurde, wurden die Puffermengen dementsprechend angepasst.

2.2.3.2 Midipräparation

Sollten Plasmide in eine Transfektion eingesetzt werden, so wurden diese mit dem *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit* isoliert, da dieses Kit einen speziellen Waschpuffer für die Entfernung von Endotoxinen enthält. Die Präparation erfolgte nach dem *high-yield protocol* des Herstellers.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Plasmiden

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmiden erfolgte im *Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer* der Firma Biozym (Oldendorf). Hierfür wurden 5 µl Plasmidlösung nach Herstellerangaben verwendet. Midipräparationen wurden zuvor 1:3 mit Elutionspuffer aus dem *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit* verdünnt.

2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Amplifikaten wurde von der Firma LGC Genomics (Berlin) als *FlexiRun* durchgeführt. Hierfür wurde die DNA nach den Anforderungen von LGC Genomics eingeschickt. Die benötigten Primer wurden entweder separat mitgeschickt oder die Synthese direkt bei LGC Genomics in Auftrag gegeben. Die typische Leseweite betrug 800 - 1.000 bp.

2.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten wurde eine Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde 1 % (w/v) Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1x TAE gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Proben die den *10x FastDigest Green Buffer* der Firma Fisher Scientific (Schwerte) oder den *5x Green GoTaq Flexi Buffer* der Firma Promega (Mannheim) enthielten, konnten direkt ohne Ladepuffer auf das Gel geladen werden. Alle anderen Proben wurden zuvor mit 6x Ladepuffer versetzt. Zusätzlich wurden 5 µl *1 Kb Plus DNA Ladder* als Größenstandard auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte in 1x TAE als Laufpuffer bei 75 V für ca. 40 min.

Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde die Agaroselösung nach dem Aufkochen mit 0,1 µg Ethidiumbromid pro ml versetzt. Sollte die aufgetrennte DNA anschließend für eine Klonierung oder Sequenzierung verwendet werden, wurde die Auftrennung jedoch in einem Ethidiumbromid-freien Gel durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Methyleneblau gefärbt, sodass die Banden unter normalem Licht sichtbar waren. Dafür wurde das Gel 20 min in einer 0,02 %igen (w/v) Methyleneblaulösung unter Schütteln gefärbt und anschließend mit H₂O entfärbt bis die Banden deutlich sichtbar waren. Das H₂O wurde dabei mehrmals gewechselt.

2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

2.2.6.1 Aufreinigung aus Enzymreaktionen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten aus Enzymreaktionen wurden das *QIAquick PCR Purification Kit* und das *innuPREP PCRpure Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in 30 µl Elutionspuffer.

2.2.6.2 Aufreinigung aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten aus Agarosegelen wurden das *QIAquick Gel Extraction Kit* und das *innuPREP Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in 30 µl Elutionspuffer.

2.2.7 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle von einigen Klonierungen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden *FastDigest* Restriktionsenzyme der Firma Fisher Scientific (Schwerte) verwendet. Der Reaktionsansatz (Tabelle 2.11) wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym wenn möglich nach Herstellerangaben deaktiviert.

Tabelle 2.11: Reaktionsansätze für den Restriktionsverdau

	Einfachverdau	Doppelverdau
<i>10x FastDigest Green Buffer</i>	2 µl	2 µl
Plasmid	1 µg	1 µg
<i>FastDigest</i> Enzym 1 (1 FDU/µl)	1 µl	1 µl
<i>FastDigest</i> Enzym 2 (1 FDU/µl)	----	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl

2.2.8 Polymerasekettenreaktion

2.2.8.1 PCR mit der *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase

Für die Amplifikation von viraler DNA aus hochtitrigen Seren sowie von Plasmiden wurde die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase mit einer Fehlerrate von nur $4,4 \times 10^{-7}$ verwendet. Im Vergleich zu einer normalen *Taq* DNA Polymerase hat sie eine 50-fach geringere Fehlerrate. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.12 entnommen werden. Der Hotstartmix wurde nach dem Erhitzen der Probe bei 80 °C direkt in der PCR-Maschine hinzugegeben. Wenn nicht anders angegeben wurde die Anlagerungstemperatur (T_A) 3 °C geringer als die niedrigere Schmelztemperatur der beiden Primer gewählt. Für die Amplifikation von Plasmiden waren 35 Zyklen ausreichend, für die Amplifikation von Seren waren 45 Zyklen nötig.

Tabelle 2.12: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen	
5x <i>Phusion HF Buffer</i>	10,0 µl		95 °C 1 min
Template	5,0 µl	Hotstart	80 °C 30 s
dNTP Mix (10 mM)	1,0 µl		80 °C Zugabe Hotstartmix
Primer 1 (10 µM)	3,0 µl	Denaturierung	95 °C 1 min
Primer 2 (10 µM)	3,0 µl	Denaturierung	95 °C 10 s
DMSO (optional)	2,5 µl	Anlagerung	T_A °C 30 s
H ₂ O	ad 45 µl	Elongation	72 °C 20 s/kb
+ Hotstartmix		Elongation	72 °C 10 min
3,5 µl H ₂ O			
1,0 µl 10x <i>Phusion HF Buffer</i>	5,0 µl		
0,5 µl <i>Phusion</i> DNA Polym.			(Anlagerungstemperatur: $T_A = T_M - 3$)

2.2.8.2 PCR mit der *PfuTurbo* DNA Polymerase

Für die Amplifikation von niedrigtitrigen Seren wurde die *PfuTurbo* DNA Polymerase verwendet. Sie ist deutlich sensitiver als die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase und hat eine Fehlerrate von $1,3 \times 10^{-6}$. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.13 entnommen werden. Für besonders niedrigtitrige Seren wurde die Zyklenzahl von 35 auf 45 erhöht.

Tabelle 2.13: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die *PfuTurbo* DNA Polymerase

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen	
10x <i>cloned Pfu reaction buffer</i>	5 µl	Denaturierung	95 °C 2 min
Template	5 µl	Denaturierung	95 °C 30 s
dNTP Mix (10 mM)	1 µl	Anlagerung	60 °C 30 s
Primer Will1-xs (10 µM)	3 µl	Elongation	72 °C 1 min/kb
Primer Will2-xs (10 µM)	3 µl	Elongation	72 °C 10 min
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	2 µl		
H ₂ O	ad 50 µl		

2.2.8.3 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von einigen Klonierungen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze ein wenig Zellmaterial in dem Reaktionsansatz gelöst und mit dem restlichen Material eine Flüssigkultur (2.2.1) angeimpft. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.14 entnommen werden.

Tabelle 2.14: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
5x <i>Green GoTaq Flexi Buffer</i>	5,0 µl	Denaturierung	95 °C	3 min
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl	Denaturierung	95 °C	45 s
dNTP Mix (10 mM)	0,1 µl	Anlagerung	T _A °C	30 s
Primer 1 (10 µM)	1,25 µl	Elongation	72 °C	1 min/kb
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl	Elongation	72 °C	10 min
<i>GoTaq DNA Polymerase</i> (5 U/µl)	0,25 µl			
H ₂ O	ad 25 µl	(Anlagerungstemperatur: T _A = T _M - 3)		

} 30x

2.2.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Alle quantitativen Polymerasekettenreaktionen (qPCRs) wurden im *LightCycler 480 II* der Firma Roche (Penzberg) durchgeführt.

2.2.9.1 X-PCR

Die X-PCR wurde zur Quantifizierung der HBV-Genomäquivalente in Seren verwendet (Jursch et al. 2002). Sie ist sensitiver als die HOPE-PCR (2.2.9.2) dafür jedoch nicht diskriminierend gegenüber Plasmiden. Da die Primer sowie die Sonde in hochkonservierten Bereichen des X-ORFs binden, kann diese PCR zur Quantifizierung von einem Großteil der HBV-Genotypen verwendet werden. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 2.15 und die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.16 entnommen werden.

Als Standard für die absolute Quantifizierung diente aus dem Serum ID382 aufgereinigte DNA.

Tabelle 2.15: Reaktionsansatz für die X-PCR

Reaktionsansatz	
<i>ABsolute QPCR Capillary Mix (2X)</i>	7 µl
Primer X2-sense (10 µM)	1 µl
Primer X2-antisense (10 µM)	1 µl
X-Taqmansonde (5 µM)	1 µl
Template	10 µl

Tabelle 2.16: Reaktionsbedingungen für die X-PCR

Reaktionsbedingungen				
Aktivierung	95 °C	15 min		
Touchdown	95 °C	10 s	-1 °C pro Zyklus einmalige Messung	} 12x
	62 °C	15 s		
	72 °C	13 s		
Amplifikation	95 °C	10 s	einmalige Messung	} 33x
	50 °C	15 s		
	95 °C	13 s		
Kühlung	45 °C	30 s		

2.2.9.2 HOPE-PCR

Die HOPE-PCR wurde zur Quantifizierung der Genomäquivalente in Zellkulturüberständen verwendet. Diese PCR diskriminiert die Plasmid-DNA gegenüber der viralen rcDNA (Geipel 2011). Dafür wurden die Primer so gewählt, dass von der viralen rcDNA ein ca. 300 bp großes Fragment amplifiziert wird. Binden die Primer jedoch auf einem Plasmid mit einem 1.1-fachen HBV-Überlängenkonstrukt, ergibt sich ein deutlich größeres Amplifikat. Im Fall des pCH9-3091 wäre dieses ca. 3,4 kb groß (Abbildung 2.4). Da die Elongationszeit auf das 300 bp große Amplifikat abgestimmt ist, werden Plasmide etwa 1.000-fach ineffizienter nachgewiesen (Geipel 2011). Die HOPE-PCR wurde mit dem *ABsolute Blue QPCR SYBR Green Mix* durchgeführt. Dieser Mastermix enthält den unspezifischen Farbstoff *SYBR-Green* zur Detektion der doppelsträngigen DNA. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 2.17 und die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.18 entnommen werden.

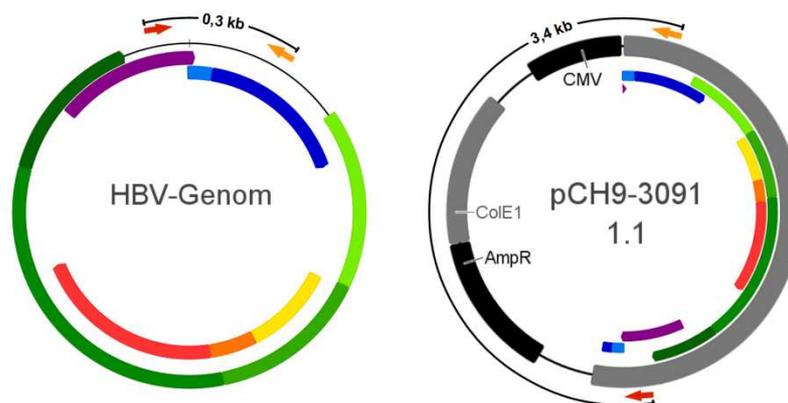


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Primer und Amplifikate der HOPE-PCR für den Replikationsnachweis von 1.1-fachen Überlängenkonstrukten. Binden die Primer (roter und orangener Pfeil) auf dem HBV-Genom (links) entsteht ein ca. 0,3 kb großes Amplifikat. Binden sie jedoch auf dem Plasmid pCH9-3091, das ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt eines HBV-Genoms enthält, entsteht ein ca. 3,4 kb großes Amplifikat. Neben dem CMV-Promotor (CMV), dem Ampicillinresistenzgen (AmpR), dem Replikationsursprung für *E. Coli* (ColE1) und den Primern (roter und orangener Pfeil) sind auch die ORFs des HBV dargestellt: Polymerase (grün), HBs (gelbrot), Core (blau) und X (lila).

Sämtliche HOPE-PCRs wurden mit einem Standard aus manuell aufgereinigtem Zellkulturüberstand absolut quantifiziert. Dafür wurde das Wildtypkonstrukt pCH9-3091 in HuH7-München Zellen transfiziert (2.2.14), die Zellen am nächsten Tag wie für den phänotypischen Assay zur Resistenzbestimmung gewaschen (2.2.16.1) und drei Tage ohne eine Inhibition durch ein Nukleos(t)idanalogen inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde aufgereinigt (2.2.12.1) und die HBV-Genomäquivalentmenge des Eluats mit Hilfe des WHO-Standards bestimmt.

Tabelle 2.17: Reaktionsansatz für die HOPE-PCR

Reaktionsansatz	
<i>Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (2x)</i>	8 µl
Primer HOPE Ke-Forward (10 µM)	1 µl
Primer HOPE Ke-Reverse (10 µM)	1 µl
Template	10 µl

Tabelle 2.18: Reaktionsbedingungen für die HOPE-PCR

Reaktionsbedingungen			
Aktivierung	95 °C	15 min	
Amplifikation	95 °C	15 s	} 40x
	60 °C	10 s	
	72 °C	20 s	
Schmelzkurve	95 °C	10 s	
	60 °C	15 s	
	95 °C	6 °C/min	kontinuierliche Messung
Kühlung	45 °C	30 s	

2.2.9.3 dsDNase-PCR

Die dsDNase-PCR wurde zur Quantifizierung der Genomäquivalente in Zellkulturüberständen verwendet, wenn ein 1.5-faches Überlängenkonstrukt transfiziert wurde. Der Plasmidhintergrund wurde hier mit einer doppelstrangspezifischen DNase (dsDNase) reduziert. Sie verdaut die Plasmide, jedoch nicht den einzelsträngigen Bereich des HBV-Genoms, der mit der PCR nachgewiesen wurde. Eine Diskriminierung der Plasmide gegenüber den HBV-Genomen wie bei der HOPE-PCR war hier aufgrund des größeren doppelten Sequenzbereiches in den 1.5-fache Überlängenkonstrukten nicht möglich (Abbildung 2.5).

Die dsDNase konnte direkt zum PCR-Ansatz gegeben werden und wurde durch die Aktivierung der Polymerase bei 95 °C deaktiviert. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 2.19 und die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.20 entnommen werden.

Für eine absolute Quantifizierung wurde der gleiche Standard wie für die HOPE-PCR (2.2.9.2) genutzt.

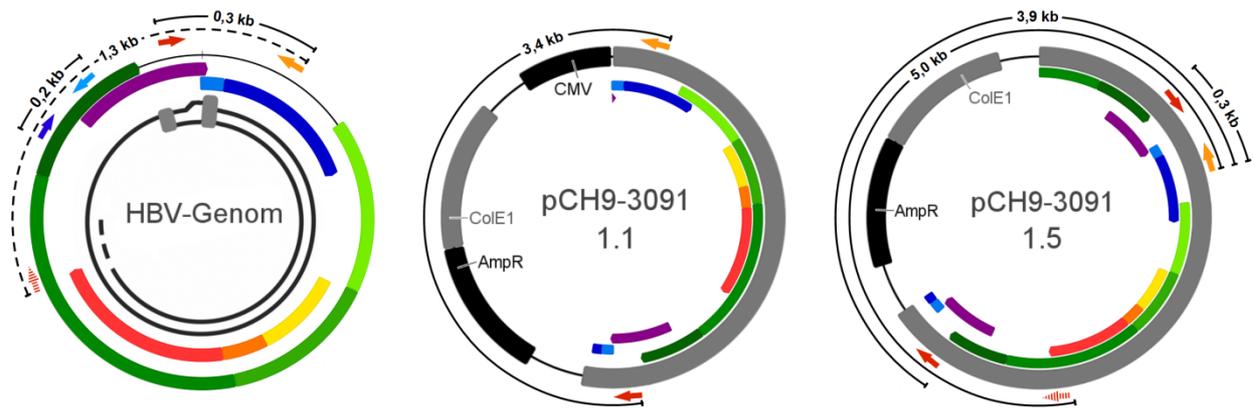


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Primer und Amplifikate der dsDNase-PCR für den Replikationsnachweis von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten. Wird ein 1.5-faches Überlängenkonstrukt in das Plasmid pCH9-3091 (rechts) kloniert, ist gut ein Drittel des Genoms doppelt vorhanden aufgrund dessen bindet der Senseprimer für die HOPE-PCR zweimal (rote Pfeile). Daher werden zwei Fragmente amplifiziert (ca. 0,3 kb und 3,9 kb), wobei das kleinere die gleiche Größe wie das Amplifikat vom HBV-Genom besitzt. Zum Vergleich: auf einem Vektor mit 1.1-fachen Überlängenkonstrukt (Mitte) binden die Primer nur einmal und amplifizieren ein 3,4 kb großes Fragment. Durch das Versetzen des Senseprimers, sodass er nur einmal auf dem 1.5-fachen Überlängenkonstrukt bindet (gestrichelter roter Pfeil), wird vom Vektor ein 5,0 kb großes Fragment und vom HBV-Genom ein 1,3 kb großes Fragment amplifiziert. Die Primer für die dsDNase-PCR (blaue Pfeile) amplifizieren ein 0,2 kb großes Fragment. Neben dem CMV-Promotor (CMV), dem Ampicillinresistenzgen (AmpR), dem Replikationsursprung für *E. Coli* (ColE1) und den Primern (roter und oranger Pfeil) sind auch die ORFs des HBV dargestellt: Polymerase (grün), HBs (gelbrot), Core (blau) und X (lila). Die partiell doppelsträngige Struktur des HBV-Genoms ist links in der Mitte angedeutet (schwarz).

Tabelle 2.19: Reaktionsansatz für die dsDNase-PCR

Reaktionsansatz	
<i>Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (2x)</i>	8,0 µl
Primer dsDNase-fw (10 µM)	1,0 µl
Primer dsDNase-rev (10 µM)	1,0 µl
DTT (100 mM)	0,2 µl
dsDNase (2 U/µl)	0,5 µl
Template	10,0 µl

Tabelle 2.20: Reaktionsbedingungen für die dsDNase-PCR

Reaktionsbedingungen				
dsDNase Verdau	37 °C	2h		
Deaktivierung / Aktivierung	95 °C	15 min		
Amplifikation	95 °C	15 s	} 40x	
	60 °C	10 s		
	72 °C	20 s		einmalige Messung
	95 °C	10 s		
Schmelzkurve	60 °C	15 s		
	95 °C	6 °C/min	kontinuierliche Messung	
Kühlung	45 °C	30 s		

2.2.10 Ortsspezifische Mutagenese

Mithilfe der ortsspezifische Mutagenese (*site directed mutagenesis*) wurden spezifisch Mutationen in das Polymerasegen von 1.1-fachen HBV-Überlängenkonstrukten eingefügt. Die ortsspezifische Mutagenese beruht auf der Amplifikation des vollständigen Plasmids mit zwei zueinander komplementären Primern, die in der Mitte die Mutation tragen. Die Template-DNA wird anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut um den Hintergrund in der anschließenden Transformation zu verringern. DpnI verdaut ausschließlich dam-methylierte DNA, daher bleibt das PCR-Amplifikat intakt (Papworth et al. 1996).

Die Primer wurden mit *PrimerX* (www.bioinformatics.org) nach dem Protokoll *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit by Stratagene* konstruiert. Die Zusammensetzung sowie die Reaktionsbedingungen der PCR können Tabelle 2.21 entnommen werden. Der Zusatz von DMSO war nur für das Einfügen von Mutationen in den Vektor pCEP-Puro nötig. Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz mit 5 µl 10x *Buffer Tango* sowie 2 µl DpnI versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach das Enzym in 20 min bei 80 °C inaktiviert. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes in eine Transformation (2.2.2) eingesetzt.

Tabelle 2.21: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die ortsspezifische Mutagenese

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
10x <i>cloned Pfu reaction buffer</i>	5,0 µl	Denaturierung	95 °C	30 s
Plasmid	5-50 ng	Denaturierung	95 °C	30 s
dNTP Mix (10 mM)	1,0 µl	Anlagerung	55 °C	1 min
Primer 1	125 ng	Elongation	68 °C	1 min/kb
Primer 2	125 ng	Elongation	72 °C	10 min
DMSO (optional)	2,5 µl			
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	2,0 µl			
H ₂ O	ad 50 µl			

} 18x

2.2.11 Klonierungen mit dem *In-Fusion HD Cloning System*

Bei dieser Klonierungsmethode werden Vektor und Insert über die Erkennung von 15 bp langen komplementären Bereichen an den Enden der DNA-Moleküle zusammengefügt. Der genaue molekularbiologische Mechanismus wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Der große Vorteil dieser Methode ist die Unabhängigkeit vom Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen. Die beiden hier verwendeten Anwendungen des *In-Fusion HD Cloning System* wurden von Dr. A. Geipel (2011) etabliert.

2.2.11.1 Ganzgenomklonierung

Für die Klonierung von vollständigen Genomen wurde die virale DNA mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* wie in 2.2.12.1 beschrieben aufgereinigt. Zuerst wurde versucht das komplette Genom mit der *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (2.2.8.1) und den Primern Will1-xs und Will2-xs (2.1.6, T_A = 60°C, modifiziert nach Günther et al. (1995)) zu amplifizieren. War dies nicht erfolgreich, wurde die PCR mit der *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.2.8.2) wiederholt. Parallel wurde der Vektor pCH9-200 (2.1.8.3) mit der *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (2.2.8.1) und den Primern Cloning-BB-Will-fw

einem Gesamtvolumen von 10 μ l mit 2 μ l *5x In-Fusion HD Enzyme Premix* gemischt und für 20 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l dieses Ansatzes in *E. coli* transformiert (2.2.2).

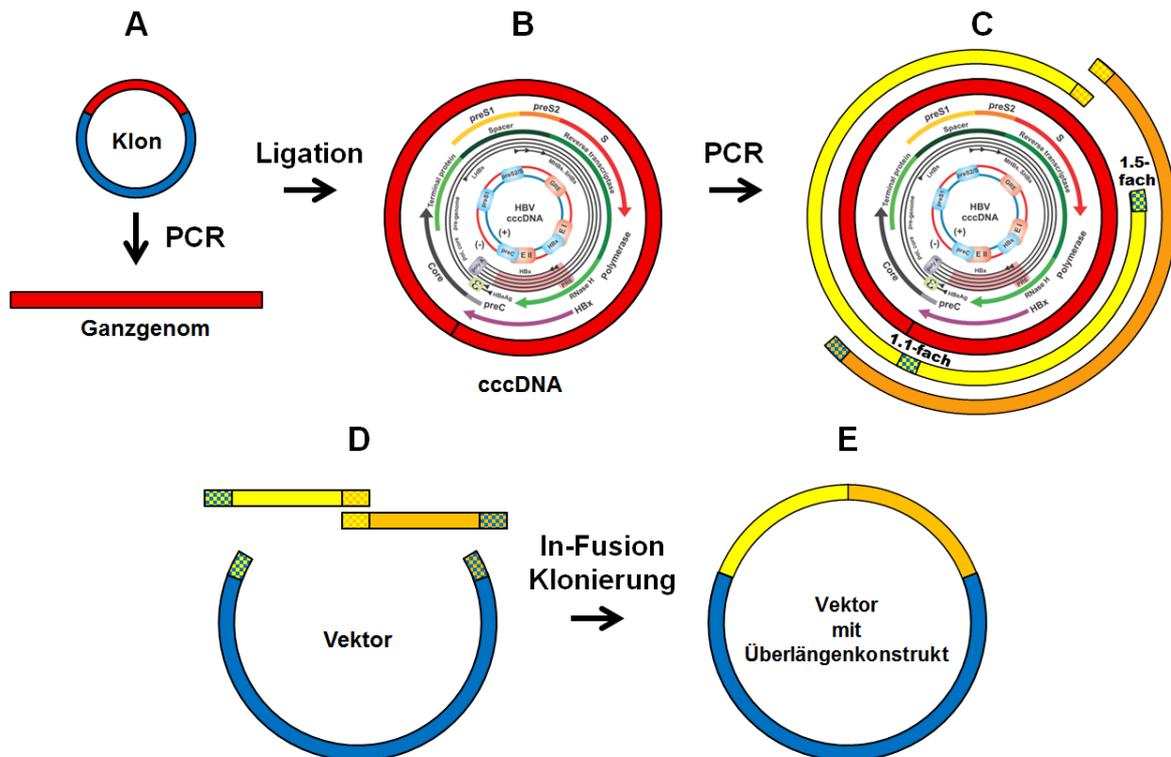


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Klonierung von 1.1-fachen und 1.5-fachen Überlängenkonstrukten ausgehend von einem klonierten Ganzgenom. Ein kloniertes und sequenziertes Ganzgenom wird amplifiziert (A) und die Enden werden ligiert, sodass ein zirkuläres Genom entsteht (B). Von dieser cccDNA können die beiden Inserts für die Klonierung des Überlängenkonstruktes amplifiziert werden (C). Dabei entscheidet die Länge des 1. Inserts (gelb) ob ein 1.1-faches oder ein 1.5-faches Überlängenkonstrukt entsteht. Die beiden Inserts werden im letzten Schritt mithilfe der In-Fusion Klonierung in einen Vektor gebracht (D und E). Abbildung verändert nach Geipel (2011) und Glebe und Bremer (2013).

Tabelle 2.22: Standardprimer für die Klonierung von Überlängenkonstrukten. Angegeben sind jeweils die Primerpaare, die verwendete Anlagerungstemperatur (T_A) sowie die entstehenden Amplifikatgrößen (kb).

Amplifikat	1.1-faches Überlängenkonstrukt			1.5-faches Überlängenkonstrukt		
	Primer	T_A	kb	Primer	T_A	kb
zirkuläres Genom	Will-P1-11-fw Will-P2-11-rev	64 °C	3,2	Will-P1-11-fw Will-P2-11-rev	64 °C	3,2
Insert 1	11-A-fw 11-N-rev	64 °C	1,8	15-A-fw 11-N-rev	64 °C	2,9
Insert 2	11-D-fw 11-I-rev	64 °C	1,6	11-D-fw 11-I-rev	64 °C	1,6
Vektor	CEPU-30nt-fw CEPU-30nt-rev	64 °C	10,0	CEPU-30nt-fw CEPU-ohneCMV-rev	64 °C	9,0

Tabelle 2.23: Angepasste Primer für die Klonierung von Überlängenkonstrukten

Verwendung	Standardprimer	angepasster Primer
Klonierung der Genotyp G Konstrukte	11-A-fw	gtA-11-A-fw
	Will-P1-11-fw	gtA-Will-P1-11-fw
Klonierung der Genotyp A Konstrukte	11-A-fw	gtG-11-A-fw
	11-I-rev	gtG-11-I-rev
	Will-P2-11-rev	gtG-Will-P2-11-rev
Klonierung der Klone 1-05, 1-06, 1-08 und 1-12	11-A-fw	HN06-A-fw
Klonierung des Klons 1-12	11-D-fw	HN06-Klon12-D-fw
	11-N-rev	HN06-Klon12-N-rev

2.2.12 Aufreinigung viraler DNA

2.2.12.1 Manuelle Aufreinigung mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*

Die Aufreinigung der viralen DNA aus Seren und Zellkulturüberständen wurde nach Herstellerangaben mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* der Firma Roche (Penzberg) durchgeführt.

2.2.12.2 Automatisierte Aufreinigung mit dem *Sample Preparation System DNA*

Die Aufreinigung der viralen DNA aus den Zellkulturüberständen des phänotypischen Assays (2.2.16) wurde in dem Pipettierautomaten *Freedom Evo 100-4D* der Firma Tecan (Männedorf) durchgeführt. Hierfür wurde das *Sample Preparation System DNA* auf das verwendete Probenvolumen angepasst und ein Programm für den Automaten etabliert. Die Viruspartikel wurden mithilfe eines speziellen Lysepuffer und dem Enzym Proteinase K lysiert. Die freigesetzte DNA wurde an magnetische Mikropartikel gebunden, mit Ethanol-haltigen Puffern gewaschen und in Wasser eluiert.

Im Pipettierautomaten wurden dafür 100 µl Zellkulturüberstand mit 70 µl H₂O, 40 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K durch resuspendieren gemischt und für 15 min bei 58 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lysepuffer und 20 µl magnetische Mikropartikel hinzugegeben, resuspendiert und nochmal für 15 min bei 58 °C inkubiert. Nun wurden die magnetischen Mikropartikel mit Hilfe eines Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Danach wurden die Mikropartikel in 300 µl *Wash1*-Puffer resuspendiert, für 2 min bei 58 °C inkubiert und der Überstand mit Hilfe des Magneten erneut abgenommen. Es folgten zwei Waschriffe mit *Wash2*-Puffer. Hierfür wurden die Mikropartikel in je 300 µl *Wash2*-Puffer resuspendiert und der Überstand unter Zuhilfenahme des Magneten wieder abgenommen. Anschließend wurden die Mikropartikel für 15 min bei 80 °C inkubiert um das restliche Ethanol aus den Waschpuffern zu verdampfen. Die getrockneten Mikropartikel wurden in 100 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 8 min bei 80 °C inkubiert. Nachdem die Mikropartikel unter Zuhilfenahme des Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen wurden, konnte das Eluat in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt werden.

2.2.13 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die verwendeten Zellen wurden im Stickstofftank bei -196 °C gelagert. Das Auftauen fand bei 37 °C im Wasserbad statt. Während des Auftauens wurden 10 ml DMEM mit Phenolrot und 10 % FKS in eine Zellkulturschale ($\varnothing = 10\text{ cm}$) vorgelegt und die aufgetauten Zellen dazu gegeben. Nachdem die Zellen sich 4 h im Brutschrank anheften konnten, wurden sie mit 10 ml PBS++ gewaschen und anschließend neues Medium hinzugegeben.

Generell fand die Kultivierung der Zellen bei 37 °C , 96 % Luftfeuchte und 7 % CO_2 statt. Wenn nicht anders angegeben wurden sie in DMEM mit Phenolrot und 5 % FKS auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm gehalten. Für die Kultivierung von HepG2-Zellen wurden die Zellkulturschalen mit Kollagen beschichtet.

Die Zellen wurden regelmäßig passagiert um eine Konfluenz von ca. 50 % zu halten. Dafür wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen und in einer Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst hatten. In der Zwischenzeit wurde neues vorgewärmtes Medium in die entsprechende Anzahl an Zellkulturschalen vorgelegt. Die Zellen wurden in der Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert und auf die neuen Schalen ausgetropft.

2.2.14 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erhalten, sollten die Zellen für die Transfektion ca. 80 % konfluent sein. Wenn nicht anders angegeben wurden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm für die Transfektion verwendet. Sämtliche Medien, Puffer und Lösungen wurden vor dem Beginn der Transfektion vorgewärmt.

Für die Transfektion wurden $7\text{ }\mu\text{g}$ des zu transfizierenden Plasmids mit $1\text{ }\mu\text{g}$ pSEAP2-Control (2.1.8.4) und $350\text{ }\mu\text{l}$ DMEM ohne alles in einem Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz $32\text{ }\mu\text{l}$ *FuGENE* HD Transfektionsreagenz hinzugefügt, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS++ gewaschen und neues DMEM mit Phenolrot und 2 % FKS hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und diese wurden über Nacht im Brutschrank (2.2.14) inkubiert.

2.2.15 Bestimmung der Transfektionseffizienz (SEAP-Test)

Die Transfektionseffizienz wurde mit dem SEAP-Test bestimmt. Dieser nutzt eine alkalische Phosphatase (*secreted embryonic alkaline phosphatase*, SEAP), die im Gegensatz zu den im Zellkulturüberstand enthaltenen endogenen Phosphatasen hitzestabil ist und sich daher gut als Reportergen eignet (Berger et al. 1988).

Für den SEAP-Test wurde das Plasmid pSEAP2-Control kotransfiziert (2.2.14). Das Plasmid trägt das Gen für die SEAP unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Je Transfektionsansatz wurden sechsmal $50\text{ }\mu\text{l}$ Zellkulturüberstand (DMEM ohne Phenolrot) auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 min bei 65 °C inkubiert, um die endogenen Phosphatasen zu inaktivieren. Anschließend wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe des SEAP-Standards und eine Negativkontrolle auf die Mikrotiterplatte pipettiert. In jedes Well wurden nun $100\text{ }\mu\text{l}$ 2x SEAP-Puffer und $50\text{ }\mu\text{l}$ SEAP-Substrat hinzugegeben und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen. Die sechs Werte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst und mit der Standardreihe verglichen.

Für die Herstellung des laborinternen SEAP-Standards wurden 8 µg pSEAP2-Control in HuH7-München Zellen transfiziert und der Zellkulturüberstand nach drei Tagen abgenommen. Nachdem die endogenen Phosphatasen in 30 min bei 65 °C hitzeinaktiviert wurden, wurde der Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Als Negativkontrolle wurde eine nicht transfizierte Zellkulturplatte genauso behandelt wie für die Standardherstellung.

2.2.16 Phänotypischer Assay zur Resistenzbestimmung

2.2.16.1 Experimentelle Durchführung

Mit dem phänotypischen Assay wurde die Resistenz verschiedener HBV-Mutanten gegenüber den vier gängigsten Nukleosid- und Nukleotidanaloga (Nukleos(t)idanaloga) sowie die virale Fitness der Mutanten bestimmt. In veränderter Form wurde er auch zum Replikationsnachweis der 1.5-fachen Überlängenkonstrukte verwendet.

Wenn nicht anders angegeben wurden HuH7-München Zellen wie in 2.2.14 beschrieben mit dem Konstrukt der zu testenden HBV-Mutante transfiziert. Neben den zu testenden Konstrukten wurde immer auch ein Ansatz mit dem entsprechenden Wildtypkonstrukt (pCH9-3091 oder pCEP-Puro-3091-1.1) mit getestet

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturplatte abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß, in das 20 ml DMEM mit Phenolrot und 2 % FKS vorgelegt wurden, überführt und 6 min bei 60 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 25 ml DMEM mit Phenolrot und 2 % FKS resuspendiert und erneut für 6 min bei 60 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, die Zellen in 25 ml DMEM mit Phenolrot und 2 % FKS resuspendiert und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem dritten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 10 - 25 ml DMEM ohne Phenolrot und 2 % FKS aufgenommen und je 100 µl Zellsuspension pro Well auf eine 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Zuvor wurden je 100 µl der Nukleos(t)idanaloga-Verdünnungsreihen auf die Zellkulturplatte vorgelegt. Die Nukleos(t)idanaloga wurden in DMEM ohne Phenolrot und 2 % FKS verdünnt. Die beiden verwendeten Pipettierschemata sind in Tabelle 2.24 und Tabelle 2.25 angegeben.

Tabelle 2.24: Ursprüngliches Pipettierschema für den HOPE-Assay. Angegeben ist jeweils die Endkonzentration nach Zugabe der Zellen. Daher wurde die doppelte Konzentration vorgelegt. Für die nicht inhibierten Wells wurde reines Medium vorgelegt. Die mit --- markierten Wells wurden leer gelassen.

Well	Adefovir			Entecavir			Lamivudin			Tenofovir		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100.000 nM			1.000 nM			100.000 nM			100.000 nM		
B	10.000 nM			100 nM			10.000 nM			20.000 nM		
C	1.000 nM			10 nM			1.000 nM			4.000 nM		
D	100 nM			1 nM			100 nM			800 nM		
E	10 nM			1 nM			10 nM			160 nM		
F	nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert		
G	---			---			---			---		
H	---			---			---			---		

Tabelle 2.25: Verbessertes Pipettierschema für den HOPE-Assay. Angegeben ist jeweils die Endkonzentration nach Zugabe der Zellen. Daher wurde die doppelte Konzentration vorgelegt. Für die nicht inhibierten Wells wurde reines Medium vorgelegt.

Well	Adefovir			Entecavir			Lamivudin			Tenofovir		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100.000 nM			1.000 nM			100.000 nM			100.000 nM		
B	20.000 nM			200 nM			20.000 nM			20.000 nM		
C	4.000 nM			40 nM			4.000 nM			4.000 nM		
D	800 nM			8 nM			800 nM			800 nM		
E	160 nM			1,6 nM			160 nM			160 nM		
F	32 nM			0,32 nM			32 nM			32 nM		
G	nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert		
H	nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert			nicht inhibiert		

Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank (2.2.13) wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und es wurde mit dem SEAP-Test (2.2.15) die Transfektionseffizienz bestimmt. Wenn nicht anders angegeben wurde anschließend die virale DNA mit der automatisierten Aufreinigung (2.2.12.2) isoliert und die Menge an Genomäquivalenten mit der HOPE-PCR (2.2.9.2) bestimmt.

2.2.16.2 Statistische Auswertung

Die absoluten Genomäquivalentmengen aus der HOPE-PCR wurden zuerst in relative Replikationswerte umgerechnet. Dafür wurde der Mittelwert aller nicht inhibierten Werte gleich 100 % gesetzt. Mit diesen relativen Werten wurde eine nicht lineare Regression mit drei Parametern durchgeführt (Abbildung 2.8 links) um die IC_{50} und die IC_{90} sowie darauf aufbauend die entsprechenden Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) zu berechnen (Abbildung 2.8 rechts). Die IC_{50} gibt die Nukleos(t)idanalogaKonzentration an, bei der die Replikation 50 % der nicht inhibierten Proben beträgt. Analog dazu gibt die IC_{90} die Nukleos(t)idanalogaKonzentration an, bei der die Replikation 10 % der nicht inhibierten Proben beträgt. Die Resistenzfaktoren geben den Quotient aus einer Mutanten IC durch die Wildtyp IC als Maß für die Resistenz an. Für die Berechnung der Resistenzfaktoren wurden Konsensuskurven aus mehreren Wildtypmessungen verwendet.

Um festzustellen, ob der Unterschied zwischen zwei Inhibitionskurven signifikant ist, wurde eine einfaktorielle univariate ANOVA mit den beiden Datensätzen durchgeführt (Köhler et al. 2007). Hierbei wurden die Konzentrationsstufen, die beim Wildtyp noch keinen inhibitorischen Effekt zeigten, nicht für die ANOVA berücksichtigt. Bei mehreren Vergleichen mit den gleichen Datensätzen wurde das α -Niveau nach Bonferroni adjustiert (Köhler et al. 2007). Die daraus resultierenden Signifikanzgrenzen sind entsprechend in den Ergebnissen angegeben.

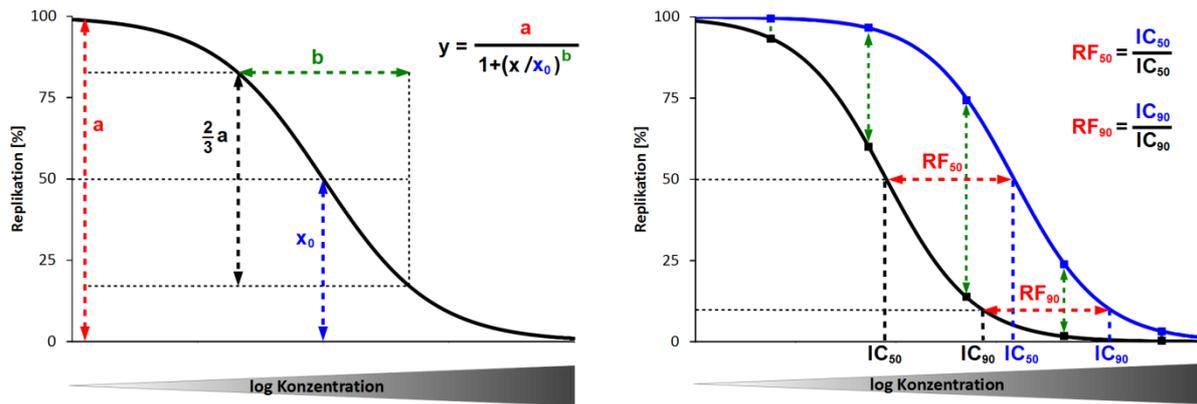


Abbildung 2.8: Regressionsmodell für die statistische Auswertung der Daten des phänotypischen Assays zur Resistenzbestimmung (links). Dargestellt ist die Replikation in % auf der y-Achse in Abhängigkeit von der Konzentration des Nukleos(t)idanalogs (logarithmisch skaliert) auf der x-Achse. Die Inhibitionskurve wird mit der rechts oben angegebenen sigmoidalen Funktion beschrieben. Sie enthält drei Parameter. Der Parameter a (rot) beschreibt die Amplitude der Kurve, also die Differenz zwischen maximaler und keiner Inhibition. Der Parameter b (grün) definiert die Steigung der Kurve (Abstand der x -Werte mit $y = 1/6 a$ und $y = 5/6 a$). Und der Parameter x_0 (blau) definiert den Wendepunkt, also den Punkt an dem $y = 1/2 a$ ist. Abbildung verändert nach (Geipel 2012). **Berechnung der IC_{50} und IC_{90} sowie der Resistenzfaktoren aus den Daten des phänotypischen Assays zur Resistenzbestimmung (rechts).** Dargestellt ist die Replikation in % auf der y-Achse in Abhängigkeit von der Konzentration des Nukleos(t)idanalogs (logarithmisch skaliert) auf der x-Achse. Gezeigt sind die inhibitorischen Konzentrationen bei denen die Replikation noch 50 % (IC_{50}) bzw. 10 % (IC_{90}) beträgt sowie die dazugehörigen Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}). Die Formeln zur Berechnung der Resistenzfaktoren sind rechts oben angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer sensitiveren Amplifikation von viralen Ganzgenomen aus Patientenseren

Bisher wurde die *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase (2.2.8.1) genutzt um virale Ganzgenome aus Patientenseren zu amplifizieren. Sie benötigte mindestens 1×10^6 Genomäquivalente (GE) als Ausgangsmaterial für eine erfolgreiche Amplifikation (Abbildung 3.1). Wurde das Serum manuell mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* aufgereinigt (2.2.12.1), musste dies daher mindestens einen Titer von 5×10^7 GE/ml aufweisen.

Seren mit einem geringeren Titer konnten bisher nicht als Ganzgenom amplifiziert werden. Um diese jedoch auch für eine phänotypische Charakterisierung zugänglich zu machen, wurde nach einer alternativen Polymerase gesucht. Diese sollte einen Kompromiss aus einer höheren Sensitivität und einer ausreichenden Fehlerkorrektur darstellen. Wie Abbildung 3.1 zeigt, war die Amplifikation mit der *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.2.8.2) selbst mit nur 1×10^2 Genomäquivalenten als Template noch erfolgreich. Dies entspricht bei zuvor genannter Aufreinigung einem Titer von 5×10^3 GE/ml Serum. Die erhaltene Bande wurde ausgeschnitten und konnte erfolgreich in eine Ganzgenomklonierung (2.2.11.1) eingesetzt werden.

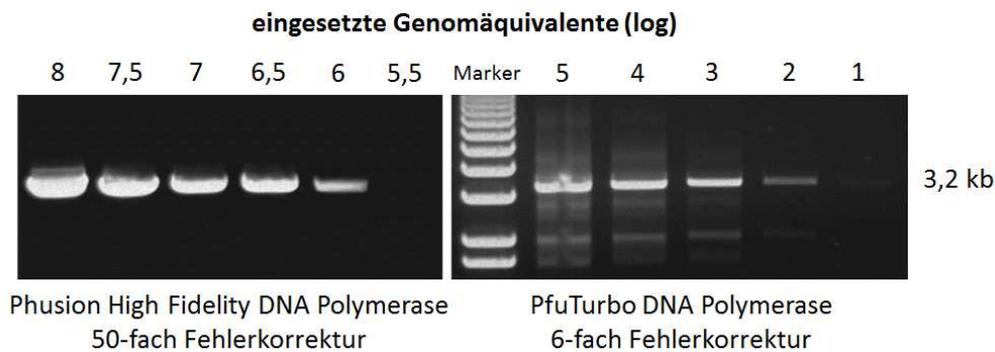


Abbildung 3.1: Sensitivität der Amplifikation von viralen Ganzgenomen. Es wurden verschiedene Mengen aufgereinigter HBV-DNA aus einem humanen Serum in die PCR eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikate wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zu den Polymerasen ist die Fehlerkorrektur im Vergleich zur *Taq* DNA Polymerase angegeben

Aufgrund der geringeren Fehlerkorrektur im Vergleich zur bereits etablierten *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase (52-fach) musste gezeigt werden, dass auch die 6-fache Fehlerkorrektur für eine fehlerfreie Amplifikation des HBV-Genoms ausreichend ist. Dafür wurde ein bereits kloniertes HBV-Genom aus dem Plasmid pCH9-3091 als ein Template mit einer definierten Sequenz amplifiziert und kloniert. Von zehn Klonen wurde das gesamte Genom sequenziert und mit der Sequenz des Ursprungsplasmids verglichen. Dabei wurde kein Fehler festgestellt.

3.2 Klonierung und Replikationsnachweis von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukte nach transients Transfektion

3.2.1 Etablierung eines PCR-basierten Replikationsnachweises

Der Replikationsnachweis von HBV-Überlängenkonstrukten nach einer transienten Transfektion ist mit einer normalen quantitativen PCR nicht möglich. Der Plasmidhintergrund, der durch die große Zahl an transfizierten Plasmiden entsteht, würde das Signal der neu gebildeten HBV-Genome überlagern. Die HOPE-PCR (2.2.9.2) löst dieses Problem in dem sie die Plasmid-DNA gegenüber den neu produzierten HBV-Genomen bei der Amplifikation diskriminiert. Dieses Prinzip funktioniert für 1.1-fache Überlängenkonstrukte, jedoch nicht bei 1.5-fachen, da der Senseprimer auf dem Plasmid doppelt bindet (Abbildung 2.5). Daher wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht, um den Plasmidhintergrund zu verringern. Es wurden verschiedene Enzyme getestet, die die doppelsträngige Plasmid-DNA unspezifisch verdauen (dsDNase) oder zumindest so fragmentieren, dass eine Amplifikation nicht mehr möglich ist (Restriktionsenzyme DpnI und BamHI).

Die verschiedenen Möglichkeiten der Reduzierung des Plasmidhintergrunds wurden getestet, indem HBV-DNA aus einem humanen Serum, Plasmid-DNA (pCH9-3091) und DNA aus Zellkulturüberständen (nicht inhibiert und inhibiert) mit den verschiedenen Methoden nachgewiesen wurden. Für die Zellkulturüberstände wurde das Plasmid pCH9-3091 in HuH7-München Zellen transfiziert (2.2.14), die Zellen gewaschen (2.2.16.1) und drei Tage ohne Nukleos(t)idanalogen (nicht inhibiert) und mit 1000 nM Entecavir (inhibiert) inkubiert. Die vier Proben wurden dann in die verschiedenen Enzymreaktionen und PCRs eingesetzt. Als Referenz diente die Quantifizierung mit der X-PCR, die Plasmide und HBV-DNA gleichermaßen nachweist. Die mit der X-PCR gemessenen DNA-Mengen wurden gleich 100 % gesetzt (Abbildung 3.2).

Die diskriminative HOPE PCR konnte 60 % der HBV-DNA aus dem Serum nachweisen, während nur 0,01 % der Plasmide nachgewiesen wurden (Abbildung 3.2). In der nicht inhibierten Probe wurde etwa 100-mal so viel Signal detektiert, wie in der inhibierten Probe.

Als erste Alternative zur HOPE-PCR wurden die Proben wie in 2.2.7 beschrieben mit DpnI verdaut. Dieses Enzym schneidet nur dam-methylierte DNA. Die Proben wurden 1:10 verdünnt in die X-PCR eingesetzt, da ansonsten der Puffer des Restriktionsenzym die PCR inhibiert hätte. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, konnte die Plasmidmenge durch den DpnI-Verdau auf ca. 5 % reduziert werden. Von der HBV-DNA wurden noch 27 % nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen inhibiertem und nicht inhibiertem Zellkulturüberstand war nicht nachweisbar. In beiden Überständen wurde nur ca. 1 % der DNA im Vergleich zur Referenz nachgewiesen.

Das Enzym dsDNase verdaut ausschließlich doppelsträngige DNA. Die Primer der für diesen Ansatz verwendeten qPCR (2.2.9.3) binden im einzelsträngigen Bereich des partiell doppelsträngigen HBV-Genoms (Abbildung 2.5). Die dsDNase konnte direkt mit in den PCR-Reaktionsansatz gegeben werden. Der Verdau erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C, das Enzym wurde anschließend durch die Aktivierung der Polymerase bei 95 °C deaktiviert (2.2.9.3). Die Plasmidmenge konnte so um fast drei Zehnerpotenzen verringert werden (Abbildung 3.2). Von der HBV-DNA wurden dagegen noch etwa 34 % nachgewiesen. Zwischen nicht inhibiertem und inhibiertem Zellkulturüberstand konnte ein deutlicher Unterschied von 17 % zu 2 % gemessen werden.

Das ebenfalls verwendete Enzym BamHI gehört zu den Typ II Restriktionsenzymen, die ebenfalls nur doppelsträngige DNA schneiden. Unter anderem befindet sich eine BamHI-Schnittstelle im Amplifikat der dsDNase-PCR. Da dieser Bereich jedoch bei der rcDNA-Form des HBV-Genoms einzelsträngig ist, bleibt er im Gegensatz zum Plasmid intakt. Der Verdau wurde wie unter 2.2.7 durchgeführt und die Proben 1:10 verdünnt in die dsDNase-PCR eingesetzt, wobei die PCR ohne dsDNase-Verdau durchgeführt wurde. Mit dieser Methode wurden 98 % der HBV-Genome aus dem Serum, aber nur 0,5 % der Plasmide nachgewiesen. Allerdings war die detektierte DNA-Menge im inhibierten Zellkulturüberstand nur fünfmal geringer als im nicht inhibierten Überstand.

Zusätzlich wurde auch die Kombination aus BamHI- und dsDNase-Verdau getestet. Dafür wurden die Proben wie unter 2.2.7 beschrieben verdaut und 1:10 in die dsDNase-PCR (inkl. Verdau) eingesetzt. Das Verhältnis zwischen HBV-DNA aus einem Serum und Plasmid-DNA konnte im Vergleich zur alleinigen dsDNase-PCR jedoch nicht verbessert werden (Abbildung 3.2).

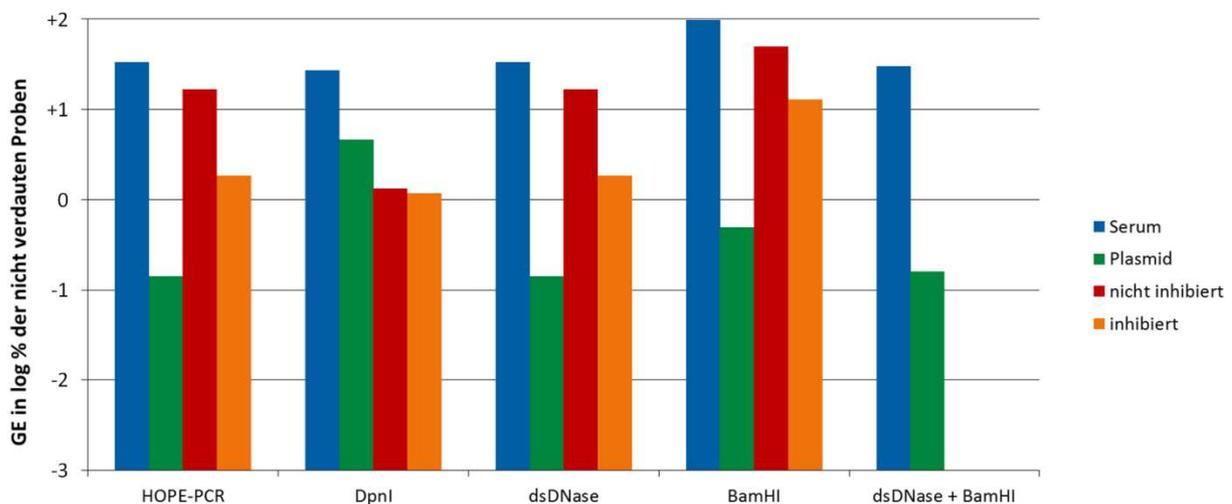


Abbildung 3.2: Vergleich verschiedener Möglichkeiten den Plasmidhintergrund im PCR-basierten Nachweis der HBV-Replikation nach transienter Transfektion zu verringern. Dargestellt sind Genomäquivalente (GE) in %, die nicht verdauten und mit der X-PCR nachgewiesenen Proben wurden gleich 100 % gesetzt. Es wurden HBV-DNA aus einem humanen Serum (blau), das Plasmid pCH9-3091 (grün) und aufgereinigte DNA aus nicht inhibierten (rot) und inhibierten (orange) Zellkulturüberständen wie folgt nachgewiesen: HOPE-PCR: HOPE-PCR mit unverdauten Proben, DpnI: X-PCR mit DpnI-verdauten Proben, dsDNase: dsDNase-PCR inkl. dsDNase-Verdau der Proben, BamHI: dsDNase-PCR mit BamHI-verdauten Proben aber ohne dsDNase-Verdau, dsDNase + BamHI: dsDNase-PCR mit BamHI-verdauten Proben inkl. dsDNase-Verdau.

Zur Verbesserung des Nachweises der viralen Replikation mit der dsDNase-PCR, wurde versucht den dsDNase-Verdau zu optimieren. Dafür wurde die eingesetzte Menge an dsDNase erhöht. Bisher wurden 0,5 Units Enzym pro Reaktion verwendet. Zwar konnte mit 2,5 Units dsDNase die Plasmidmenge von 0,3 % auf 0,01 % um mehr als eine Zehnerpotenz reduziert werden, jedoch nahm gleichzeitig der unspezifische Verdau des einzelsträngigen Teils der HBV-DNA von 35 % auf 93 % zu (Abbildung 3.3). Dieses Problem verschärfte sich noch beim Verdau mit 5 Units Enzym. Hier wurde nahezu die gesamte DNA verdaut. Nilsen et al. (2010) haben gezeigt, dass die dsDNase-Effektivität von zweiwertigen Kationen, besonders von Mn^{2+} begünstigt wird. Daher wurde versucht der PCR 1 mM $MnCl_2$ zuzusetzen. Jedoch war so keine effiziente Amplifikation in der qPCR mehr möglich (Tabelle A.1).

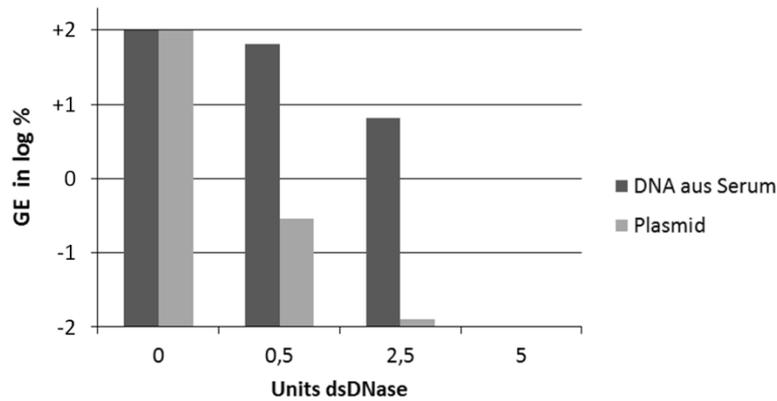


Abbildung 3.3: Optimierung der Menge an eingesetzten Units dsDNase für den PCR-basierten Replikationsnachweis von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukten. Dargestellt sind mit der dsDNase-PCR gemessene Genomäquivalente in % (logarithmisch) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Units dsDNase von Plasmid-DNA (pCH9-3091) und HBV-DNA aus einem humanen Serum.

Die dsDNase-PCR wurde aufgrund der erwähnten Ergebnisse weiterhin mit 0,5 Units dsDNase durchgeführt. Die Effektivität der PCR in Bezug auf den Replikationsnachweis mit der HOPE-PCR wurde verglichen indem verschiedene Verhältnisse Plasmid-DNA und HBV-DNA aus einem humanen Serum in der X-PCR, in der HOPE-PCR und der dsDNase-PCR eingesetzt wurden. Es wurden ca. 1×10^6 GE Plasmid-DNA (mittlerer Plasmidhintergrund) und als höchste HBV-DNA Menge ca. 7×10^5 GE (mittlere Replikation des Wildtyps) eingesetzt. Plasmid und HBV-DNA wurden alleine und in Kombination in die PCR eingesetzt, wobei eine 1:10-Verdünnungsreihe der HBV-DNA mit gleichbleibender Menge Plasmid-DNA angesetzt wurde. So sollte eine Inhibitionsreihe bei gleichem Plasmidhintergrund simuliert werden.

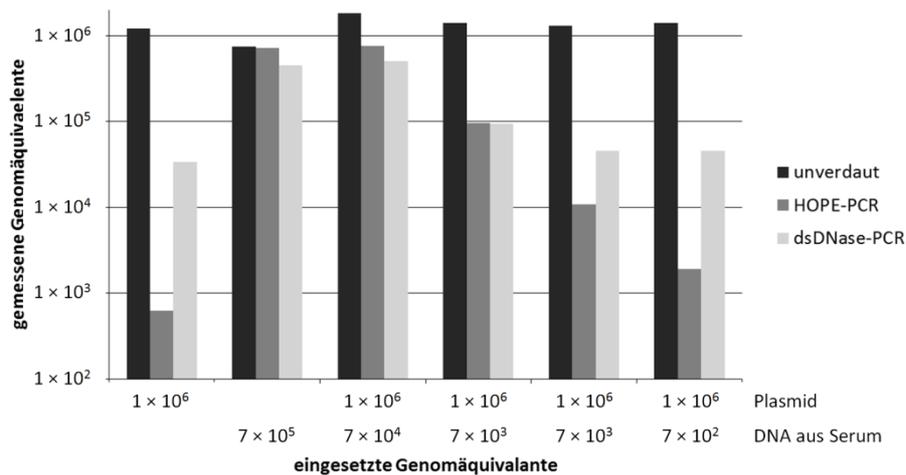


Abbildung 3.4: Bestimmung des Plasmidhintergrund in der dsDNase-PCR für den Replikationsnachweis von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukten. Dargestellt sind die gemessenen Genomäquivalente in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Plasmid-DNA und/oder HBV-DNA aus einem humanen Serum. Es wurden Plasmid-DNA (pCH9-3091) und HBV-DNA einzeln sowie in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit der X-PCR (unverdaut, dunkelgrau), mit der HOPE-PCR (mittelgrau) und mit der dsDNase-PCR (hellgrau) nachgewiesen.

Der reine Plasmidhintergrund von 1×10^6 GE ließ sich mit der HOPE-PCR auf 6×10^2 GE und mit der dsDNase-PCR auf 3×10^4 GE reduzieren. Mit der HOPE-PCR konnten 7×10^5 GE und mit der dsDNase-PCR 5×10^5 GE der eingesetzten HBV-DNA nachgewiesen werden. Bei der Kombination aus HBV-DNA und Plasmid-DNA, fielen die mit der HOPE-PCR gemessenen Genomäquivalente bis zu einem Hintergrund von 7×10^2 GE annähernd proportional zur eingesetzten Menge an HBV-DNA ab. Wurden die gleichen Proben mit der dsDNase-PCR gemessen, fiel die gemessene Genomäquivalentmenge nicht unter einen Hintergrund von 5×10^4 GE.

3.2.2 Klonierung von 1.5-fachen HBV-Überlängenkonstrukten

In 1.1-fachen Überlängenkonstrukten stehen der Polymerase- und der Core-ORF unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Um auch diese ORFs unter die Kontrolle ihrer natürlichen HBV-Promotoren zu stellen und damit die natürliche Regulation dieser ORFs untersuchen zu können, ist es nötig ein am 5'-Ende erweitertes 1.5-faches Überlängenkonstrukt zu verwenden.

Aufbauend auf die von Dr. A. Geipel (2011) etablierte Klonierung von 1.1-fachen Überlängenkonstrukten, musste lediglich der Senseprimer für das weiter 5'-liegende Insert so weit in 5'-Richtung verschoben werden, dass alle Elemente des natürlichen HBV-Promotors enthalten sind. Damit möglichst alle Genotypen mit dem gleichen Primersatz kloniert werden können, wurde anhand eines Sequenzvergleiches aller Genotypen ein konservierter Bereich (S-Domäne bzw. Reverse Transkriptase) des HBV-Genoms als Primerbindestelle gewählt. Bei der Verwendung von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten wird die Funktion des CMV-Promotors vollständig durch den natürlichen HBV-Promotor ersetzt. Daher konnte dieser aus dem Vektor entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde der Antisenseprimer (Abbildung 2.1: CEPU-ohneCMV-rev) für die Amplifikation des Vektors ebenfalls versetzt, sodass der CMV-Promotor nicht mit amplifiziert wird.

Die Klonierung wurde am Beispiel des HBV-Genoms des Plasmids pCH9-3091 nach dem in 2.2.11.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Obwohl zwei deutlich unterschiedlich große Fragmente in das Plasmid kloniert werden mussten, ergab die Klonierung mehrere Hundert korrekte Klone und war damit weiterhin äußerst effizient.

Um die Replikationsfähigkeit des 1.5-fachen Überlängenkonstrukts zu zeigen, wurde das erstellte Plasmid pCEP-Puro-3091-1.5 in HuH7-München Zellen transfiziert (2.2.14), die Zellen am nächsten Tag gewaschen (2.2.16.1) und drei Tage auf einer 24-Well-Zellkulturplatte mit verschiedenen Entecavirkonzentrationen inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden manuell aufgereinigt (2.2.12.1) und in die dsDNase-PCR (2.2.9.3) zur Quantifizierung der Genomäquivalente eingesetzt. Zum Vergleich wurde das gleiche HBV-Genom ebenfalls als 1.1-faches Überlängenkonstrukt (pCEP-Puro-3091-1.1) transfiziert. In Abbildung 3.5 (links) ist als Replikationsnachweis deutlich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Replikation zu sehen. Dabei ist kein Unterschied in der Inhibition zwischen den beiden Konstrukten zu erkennen. Betrachtet man jedoch die absolut gemessene Menge an Genomäquivalenten, ist zu erkennen, dass das 1.5-fache Überlängenkonstrukt nur ein Drittel der Replikation des 1.1-fachen Überlängenkonstrukts aufwies (Abbildung 3.5 rechts).

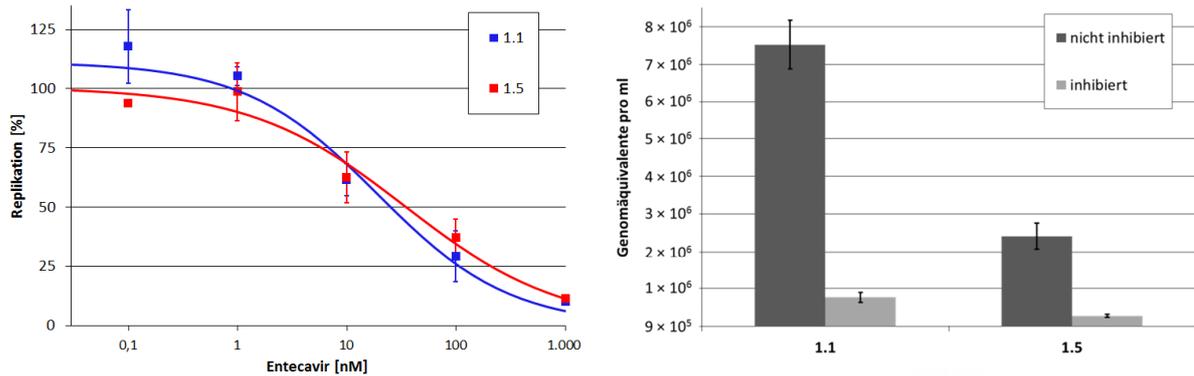


Abbildung 3.5: Replikationsnachweis eines 1.5-fachen Überlängenkonstrukts. Es wurde das Plasmid pCEP-Puro-3091-1.1, das ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt enthält zum pCEP-Puro-3091-1.5 mit einem 1.5-fachen Überlängenkonstrukt umklontiert. **Replikationsnachweis (links):** Es ist die Replikation in % der beiden Konstrukte (1.1: blau, 1.5: rot) in Abhängigkeit von der Entecavirkonzentration in nM gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler sowie die Regressionskurve. **Vergleich der Replikation (rechts):** Dargestellt sind die absoluten Mengen an Genomäquivalenten in GE/ml als Maß für die Replikation der beiden Konstrukte jeweils mit 1.000 nM Entecavir inhibiert und nicht inhibiert.

3.3 Optimierung der automatisierten DNA-Aufreinigung

Die Zellkulturüberstände des phänotypischen Assays zur Resistenzbestimmung wurden bis dato mit dem *InviMag Virus DNA/RNA Mini Kit* der Firma Stratec in dem Pipettierautomaten *Freedom Evo 100-4D* der Firma Tecan aufgereinigt (Geipel 2011). Obwohl die Linearität der Aufreinigung gewährleistet war, konnte im Vergleich zum *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* der Firma Roche (manuelle Aufreinigung) mit dem automatisierten Kit nur eine Aufreinigungseffizienz von 15 % erreicht werden (Abbildung 3.6). Bei der Suche nach einem alternativen Aufreinigungskit konnte mit dem auch für die Diagnostik zugelassenen *Sample Preparation System DNA* der Firma Abbott ein Kit gefunden werden, dass die gleiche Aufreinigungseffizienz wie das Kit der Firma Roche erreichte (Abbildung 3.6).

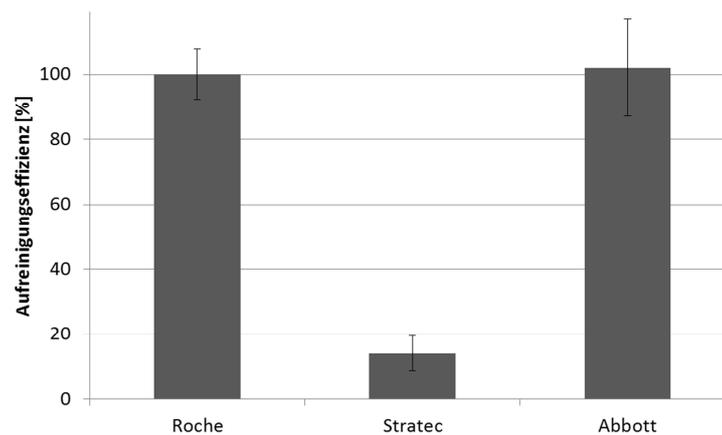


Abbildung 3.6: Vergleich der Effizienz verschiedener Kits zur automatisierten Aufreinigung viraler DNA. Es wurden Zellkulturüberstände mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche), dem *InviMag Virus DNA/RNA Mini Kit* (Stratec) und dem *Sample Preparation System DNA* (Abbott) aufgereinigt. Die Aufreinigungseffizienz des Kits der Firma Roche wurde gleich 100 % gesetzt.

Das vom Hersteller vorgeschlagene Aufreinigungsprotokoll wurde an die Bedingungen des Hochdurchsatzassays angepasst und verifiziert. Sämtliche Puffermengen wurden an das geringere Probenvolumen angeglichen. Außerdem konnte das Protokoll von fünf vorgesehenen Waschrissen auf drei gekürzt werden. Durch die vorgenommenen Veränderungen wurden eine deutliche Zeitersparnis und zusätzlich eine Kosteneinsparung von 75 % erzielt.

Abbildung 3.7 zeigt, dass die Aufreinigung in dem relevanten Konzentrationsbereich linear verläuft. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand, der auch für die Erstellung des PCR-Standards verwendet wurde (2.2.9.2), in einer 1:10-Verdünnungsreihe aufgereinigt und die HBV-Genomäquivalente anschließend mit der HOPE-PCR quantifiziert.

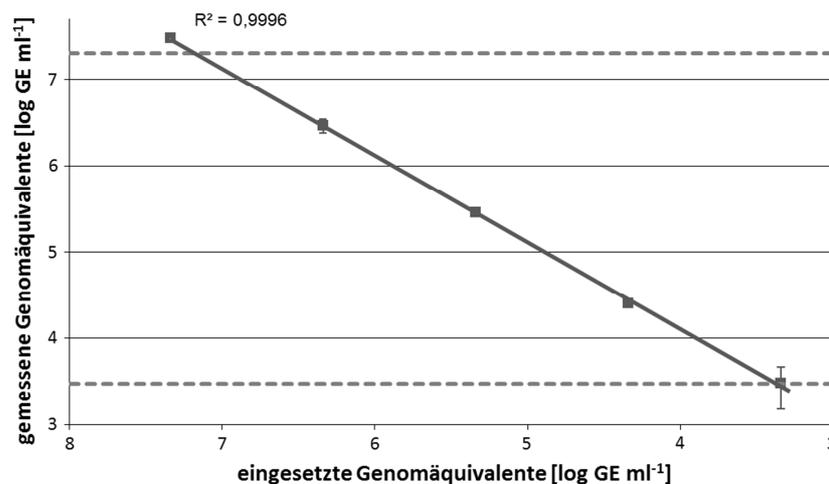


Abbildung 3.7: Linearität der automatisierten DNA-Aufreinigung mit dem *Sample Preparation System DNA*. Dargestellt sind die gemessenen Genomäquivalente in Abhängigkeit von der in die Aufreinigung eingesetzten Menge an Genomäquivalenten. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien begrenzen den im phänotypischen Assay zur Resistenzbestimmung zu erwartenden Konzentrationsbereich. Mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,9996 besteht in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang.

3.4 Phänotypisierung von HBV-Isolaten aus Seren von chronisch infizierten Patienten (HOPE-Projekt)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das HOPE-Projekt insgesamt 26 HBV-Isolate aus Patientenseren phänotypisch charakterisiert. Außerdem wurden elf durch ortsspezifische Mutagenese erstellte Klone für eine Ringstudie mit einer ebenfalls am HOPE-Projekt beteiligten Arbeitsgruppe getestet. Für alle Klone und Isolate wurde die Resistenz gegen die vier Nukleos(t)idanaloga Adefovir, Tenofovir, Entecavir und Lamivudin sowie die replikative Fitness mit dem phänotypischen Assay zur Resistenzbestimmung (2.2.16) ermittelt. Die Ergebnisse sind jeweils als Übersicht in einer Tabelle dargestellt (Tabellen 3.1 bis 3.7). Für repräsentative Beispiele sowie auffällige Isolate werden zusätzlich die Inhibitionskurven im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Abbildungen 3.8 bis 3.20).

Die Patientenisolat wurden im nachfolgenden nach ihrer Resistenz gegen die vier Nukleos(t)idanaloga in Gruppen eingeteilt. Dabei wurden HBV-Isolate mit den Primärmutationen rtM204V/I und eventuell vorhandenen Sekundärmutationen wie rtL80V/I, rtV173L, rtL180M als Lamivudin-Resistenzmuster zusammengefasst. Die beiden HBV-Isolate, die zusätzlich zur rtM204V die Mutation rtS202G oder rtI169L enthielten, wurden dagegen den Entecavir-Resistenzmustern zugeordnet. Obwohl die Mutationen

rtA181T/V auch zu einer Lamivudinresistenz führen, wurden sie zusammen mit der Mutation rtN236T der Gruppe mit Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen zugeschrieben. Diese Einteilung erfolgte aufgrund der klinisch bedeutenderen Adefovirresistenz solcher Isolate. Zusätzlich wurde ein HBV-Isolat mit einer Insertion charakterisiert, sowie Isolate ohne bekannte Resistenzmutationen getestet.

3.4.1 Vergleich der Inhibitionskurven des Wildtypkonstrukts

Aufgrund der Tatsache, dass beim Testen der Patientenisolate stets auch ein Wildtypkonstrukt (pCH9-3091) als Kontrolle mitgetestet wurde, lagen mehrere Inhibitionskurven für den Wildtyp vor. Der Assay wurde sukzessive weiter entwickelt, nach jeder Veränderung wurden neue Wildtypkonsensuskurven erstellt. Aus diesem Grund wurden die Isolate mit drei verschiedenen Konsensuskurven je Nukleos(t)idanalogen verglichen.

In Tabelle 3.1 und Abbildung 3.8 sind die Konsensuskurven vergleichend dargestellt. Es ergaben sich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Konsensuskurven. Ein statistischer Vergleich auf signifikante Unterschiede war mit der ANOVA aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationsstufen nicht möglich. Die prozentuale Standardabweichung lag für alle IC-Werte bei 14 bis 27 %. Nur die Standardabweichungen der IC₉₀ von Adefovir und der IC₅₀ von Entecavir waren höher. Die IC₅₀ bzw. IC₉₀ der beiden Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir schwankten beide um 2.000 nM bzw. 20.000 nM. Für Entecavir wurde im Mittel eine 1.000-fach und für Lamivudin eine 100-fach geringere IC₅₀ und IC₉₀ ermittelt.

Mit dem verwendeten Regressionsmodell ließen sich die gemessenen Datenpunkte sehr gut als Inhibitionskurven darstellen. Alle Bestimmtheitsmaße lagen über 0,94.

Tabelle 3.1: Vergleich der Inhibitionskurven des Wildtypkonstrukts. Aufgrund der Optimierung des Assays ergaben sich für die Charakterisierung der Isolate des HOPE-Projekts jeweils drei Wildtypkonsensus. Angegeben sind die IC₅₀, die IC₉₀ und das Bestimmtheitsmaß (R²) der Regressionskurve für die Resistenz gegen das jeweilige Nukleos(t)idanaloga. Zusätzlich sind die Mittelwerte aus allen drei Konsensus und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin	
	IC ₅₀	IC ₉₀						
	R ²		R ²		R ²		R ²	
Wildtyp Konsensus 1	1.801	15.257	1.413	13.086	1,2	11,3	227	2333
	0,98		1,00		1,00		1,00	
Wildtyp Konsensus 2	2.287	21.776	1.3272	18.654	0,9	13,8	169	1865
	0,97		0,99		1,00		0,99	
Wildtyp Konsensus 3	2.577	34.399	2.213	21.176	1,9	16,5	290	2444
	0,94		0,94		0,99		0,98	
Mittelwert	2.222	23.811	1.666	17.639	1,3	13,9	229	2.214
Standardabweichung (absolut)	392	9.732	474	4.139	0,5	2,6	61	26,5
Standardabweichung (%)	17,6	40,9	28,5	23,5	38,5	18,8	26,5	13,9

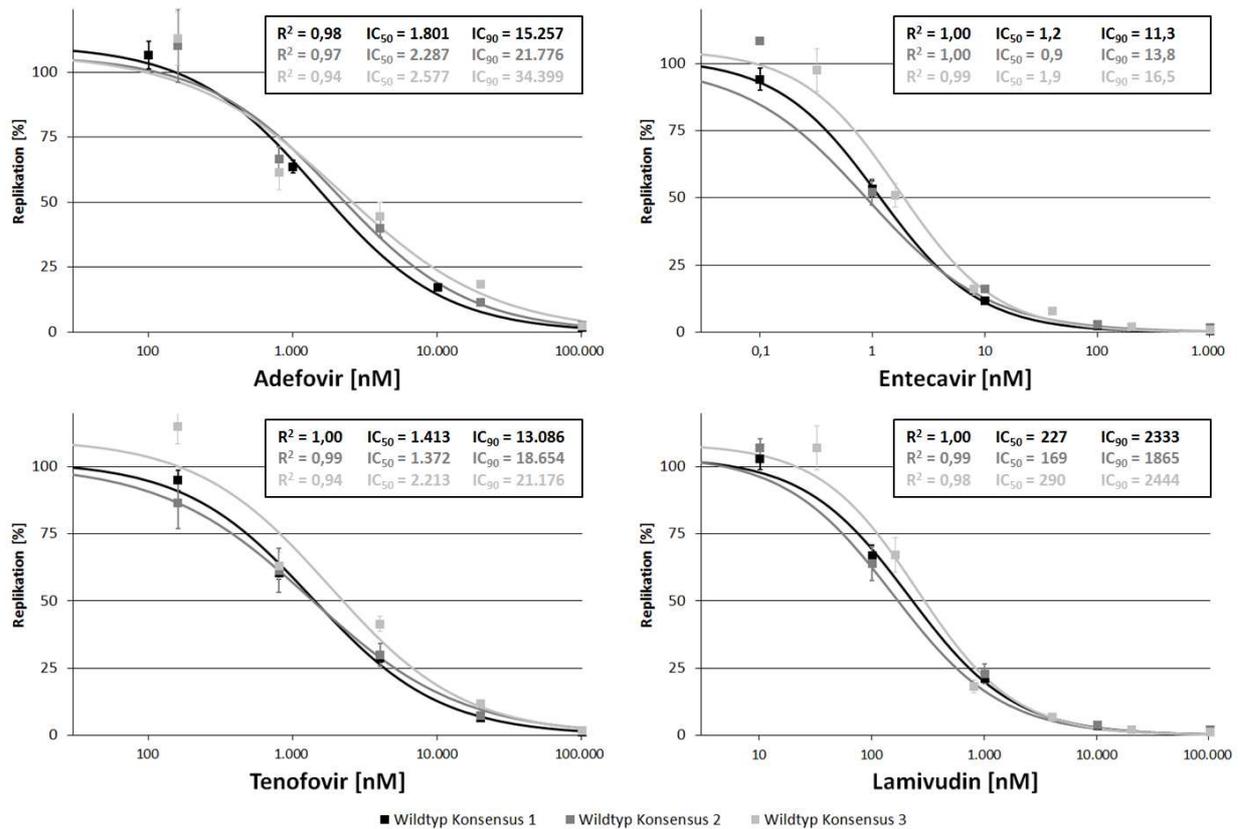


Abbildung 3.8: Vergleich der Inhibitionskurven des Wildtypkonstrukts. Dargestellt ist die Replikation der drei Wildtypkonsensuskurven in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogs in nM. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler sowie die Regressionskurven. Die Bestimmtheitsmaße (R^2) der Regressionen sowie die IC_{50} und IC_{90} sind jeweils in der Box rechts oben angegeben.

3.4.2 HBV-Isolate ohne bekannte Resistenzmutationen

Es wurden vier HBV-Isolate ohne eine bekannte Resistenzmutation getestet. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Bis auf das Isolat RK 266-1 zeigten die Isolate keine signifikanten Resistenzen gegen die vier Nucleos(t)idanaloga. Die Bestimmtheitsmaße aller Regressionen betragen mindestens 0,95. Repräsentativ sind in Abbildung 3.9 die Inhibitionskurven des Isolats MS 10-3 zu sehen. Die ermittelte Fitness der Isolate lag mit 8 bis 28 % deutlich unter der des Wildtypkonstrukts. Eine Ausnahme bildete hier das Isolat MS 10-3, das mit einer replikativen Fitness von 440 % eine äußerst hohe Replikation aufwies.

Auffällig war das Isolat RK 266-1 (Abbildung 3.10). Die Replikation dieses Isolats wurde von allen vier Nucleos(t)idanaloga signifikant stärker inhibiert als der Wildtyp.

Tabelle 3.2: HBV-Isolate ohne bekannte Resistenzmutationen in der viralen Reversen Transkriptase. Angegeben sind der Genotyp (GT), die replikative Fitness (F) in % relativ zum Wildtyp und für die Resistenzen gegen die Nukleos(t)analoge das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Inhibitionskurve sowie die Resistenzfaktoren (RF₅₀ und RF₉₀) und die Signifikanz (Sign.) des Unterschieds zum Wildtyp. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt * $\triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) sowie erhöhte Suszeptibilität (blau) unterteilt.

Isolat	Mutationen	G T	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin		F [%]
			RF ₅₀	RF ₉₀							
			Sign.	R ²							
BW 125-2	keine	D	0,8	0,7	0,5	0,7	2,5	1,1	0,7	0,7	8
			ns	0,99	ns	1,00	ns	0,95	ns	0,99	
MS 10-3	keine	A	0,9	1,0	0,8	1,2	0,7	1,2	0,7	0,8	440
			ns	1,00	ns	0,99	ns	1,00	ns	0,99	
RK 266-1	keine	C	0,2	0,5	0,4	0,8	0,1	0,1	0,2	0,4	10
			*	0,98	*	0,98	*	1,00	*	1,00	
RK 5-5	keine	D	0,3	2,2	0,8	0,9	1,6	2,1	1,6	2,3	28
			ns	1,00	ns	0,99	ns	0,95	ns	0,96	

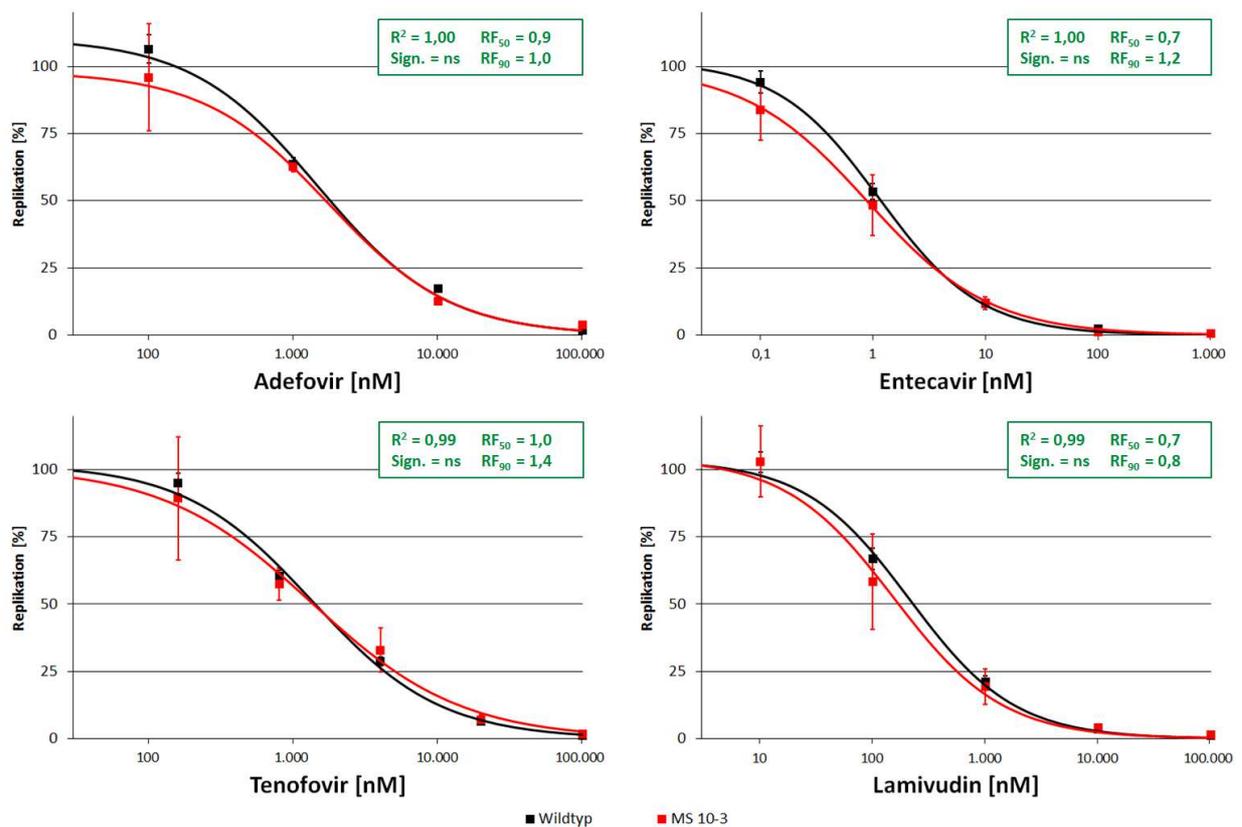


Abbildung 3.9: Resistenzprofil des HBV-Isolats MS 10-3 ohne bekannte Resistenzmutationen. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogs in nM des Isolats MS 10-3 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF₅₀ und RF₉₀) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt * $\triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

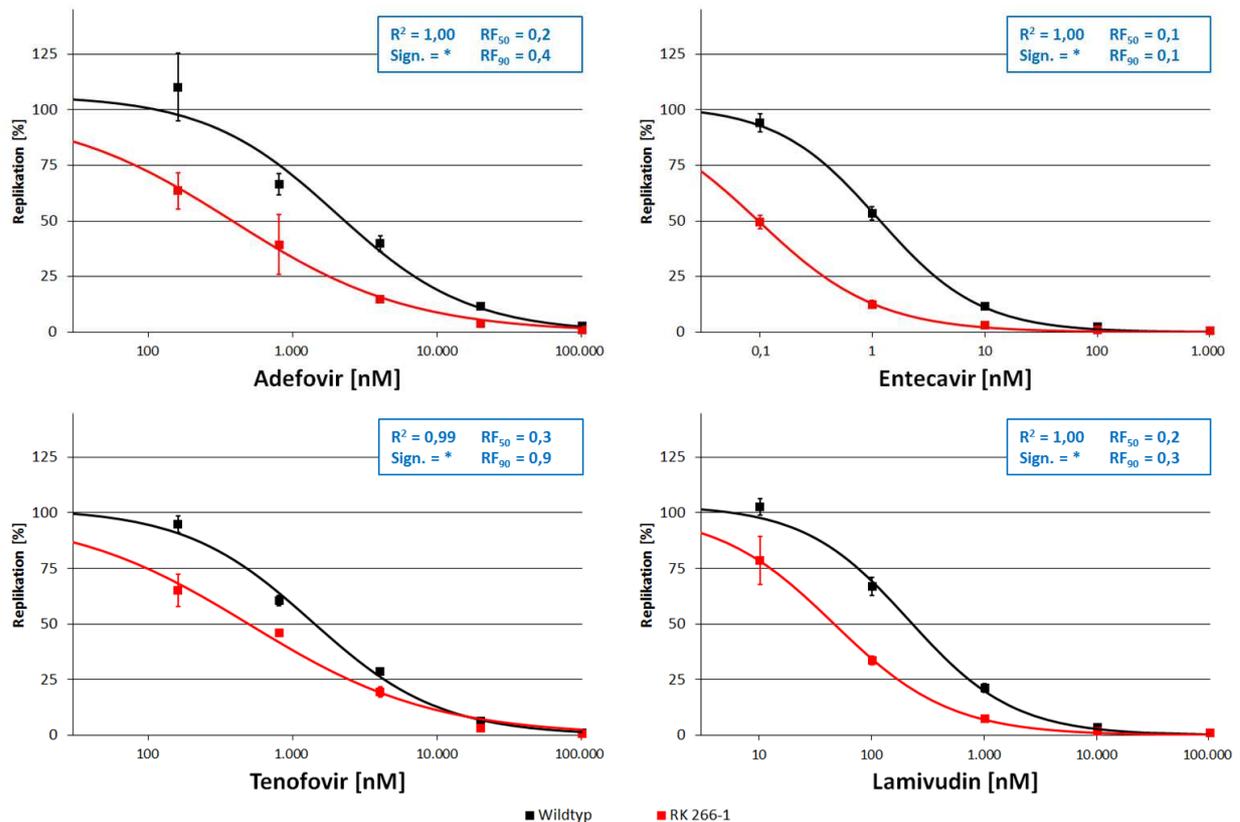


Abbildung 3.10: Resistenzprofil des HBV-Isolats RK 266-1 ohne bekannte Resistenzmutationen. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogons in nM des Isolats RK 266- (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) sowie erhöhte Suszeptibilität (blau) unterteilt.

3.4.3 HBV-Isolate mit Lamivudin-Resistenzmutationen

Insgesamt wurden 15 HBV-Isolate mit Lamivudin-Resistenzmutationen charakterisiert (Tabelle 3.3). Die Primärmutation $rtM204V$ wurde in vier Isolaten gefunden und trat ausschließlich in Kombination mit der Sekundärmutation $rtL180M$ auf. Die zweite Primärmutation $rtM204I$ wurde in elf Isolaten gefunden. Im Gegensatz zur $rtM204V$ trat diese Mutation in drei Isolaten auch ohne eine Sekundärmutation auf. Die Sekundärmutation $rtV173L$ wurde ausschließlich zusammen mit den Mutationen $rtL180M$ und $rtM204I/V$ gefunden. Die Sekundärmutationen $rtL80I/V$ traten nur in Kombination mit der Mutation $rtM204I$, jedoch nicht mit der $rtM204V$ auf.

Alle getesteten Isolate zeigten eine starke Lamivudinresistenz und eine mittlere bis starke Entecavirresistenz. In drei Isolaten wurde zusätzlich eine Adefovirresistenz festgestellt. Ein Isolat zeigte eine leichte Resistenz gegen Tenofovir.

Tabelle 3.3: HBV-Isolate mit Lamivudin-Resistenzmutationen. Angegeben sind die bekannten Resistenzmutationen in der Reversen Transkriptase, der Genotyp (GT), die replikative Fitness (F) in % relativ zum Wildtyp und für die Resistenzen gegen die Nukleos(t)analoge das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Inhibitionskurve sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz (Sign.) des Unterschieds zum Wildtyp. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) sowie erhöhte Suszeptibilität (blau) unterteilt.

Isolat	Mutationen	G T	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin		F [%]
			RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	
			Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	
VS 1-4	L180M + M204V	D	0,7	0,7	0,9	1,6	140,8	>1000	>1000	>1000	72
			ns	0,98	ns	0,99	*	0,96	*	----	
FvB 84-2	V173L + L180M + M204V	A	1,6	1,9	1,8	3,3	24,8	>1000	>1000	>1000	35
			ns	1,00	ns	0,99	*	0,99	*	----	
MS 19-2	V173L + L180M + M204V	A	3,5 *	3,4 0,98	1,5 ns	2,1 0,99	37,5 *	>1000 0,91	>1000 ----	>1000 ----	2
VS 1-5	V173L + L180M + M204V	D	4,0 *	1,5 0,95	0,6 ns	1,9 0,98	101,2 *	>1000 0,96	>1000 *	>1000 ----	10
VS 2-10	M204I	G	3,9	2,5	1,5	0,7	884,1	117,9	>1000	>1000	2
			*	0,96	ns	1,00	*	0,89	*	----	
VS 2-12	M204I	A	1,6	1,0	2,5	2,3	118,3	>1000	>1000	>1000	18
			ns	0,95	*	0,85	*	0,90	*	----	
WH 2-16-1	M204I	A	0,7	1,1	1,1	1,8	12,6	>1000	>1000	>1000	33
			ns	0,94	ns	1,00	*	0,94	*	----	
BW 103-2	L180M + M204I	A	2,1	1,2	1,6	1,0	67,7	706,1	>1000	>1000	14
			ns	0,95	ns	1,00	*	0,90	*	----	
RK 83-2	L180M + M204I	A	0,4	1,2	1,0	1,1	5,4	5,8	>1000	>1000	11
			ns	0,97	ns	0,99	*	0,99	*	----	
RK 182-2	V173L + L180M + M204I	G	0,3	0,4	0,8	1,9	42,9	195,9	>1000	>1000	53
			ns	0,94	ns	0,97	*	0,89	*	----	
BW 108-3	L80I + L180M + M204I	D	0,4	0,9	0,9	0,9	10,1	49,6	306,7	>1000	72
			ns	0,99	ns	1,00	*	0,93	*	0,93	
BW 107-3	L80I + M204I	B	0,4	0,6	0,9	1,0	43,0	>1000	>1000	>1000	59
			ns	0,99	ns	0,99	*	0,99	*	----	
BW 113-5	L80I + M204I	D	0,5	0,5	0,7	0,7	52,0	155,3	>1000	>1000	254
			ns	1,00	ns	1,00	*	0,99	*	----	
BW 108-5	L80I + M204I	D	1,1	0,6	1,1	0,6	4,4	119,8	>1000	>1000	117
			ns	0,99	ns	0,98	*	0,99	*	----	
BW 113-1	L80V + M204I	D	0,6	2,2	0,5	0,7	7,1	322,9	>1000	>1000	86
			ns	0,84	ns	1,00	*	0,97	*	----	

Abbildung 3.11 zeigt die Inhibitionskurven des Isolats VS 1-4 als Beispiel für ein typisches Isolat mit der Primärmutation rtM204V. In dem verwendeten Konzentrationsbereich konnte keine Inhibition durch Lamivudin gemessen werden. Die Replikation betrug auch bei 100.000 nM etwa 100 %. Daher wurde hier auf eine Regression verzichtet und es wurden keine exakten Resistenzfaktoren berechnet. Für Entecavir ergab sich ein hoher RF_{50} von 140,8. Der RF_{90} konnte nicht exakt ermittelt werden. Die Inhibitionskurve ist hier nicht nur nach rechts verschoben, sondern es ist deutlich zu erkennen, dass die

Kurve im Vergleich zum Wildtyp flacher abfällt. Die Inhibitionskurven der Nucleotidanaloga Adefovir und Tenofovir ähneln sehr stark der Kurve des Wildtypkonsensus. Dies spiegelt sich auch in den Resistenzfaktoren, die im Bereich von 0,7 bis 1,6 lagen, wieder und wurde durch die nicht signifikante ANOVA bestätigt.

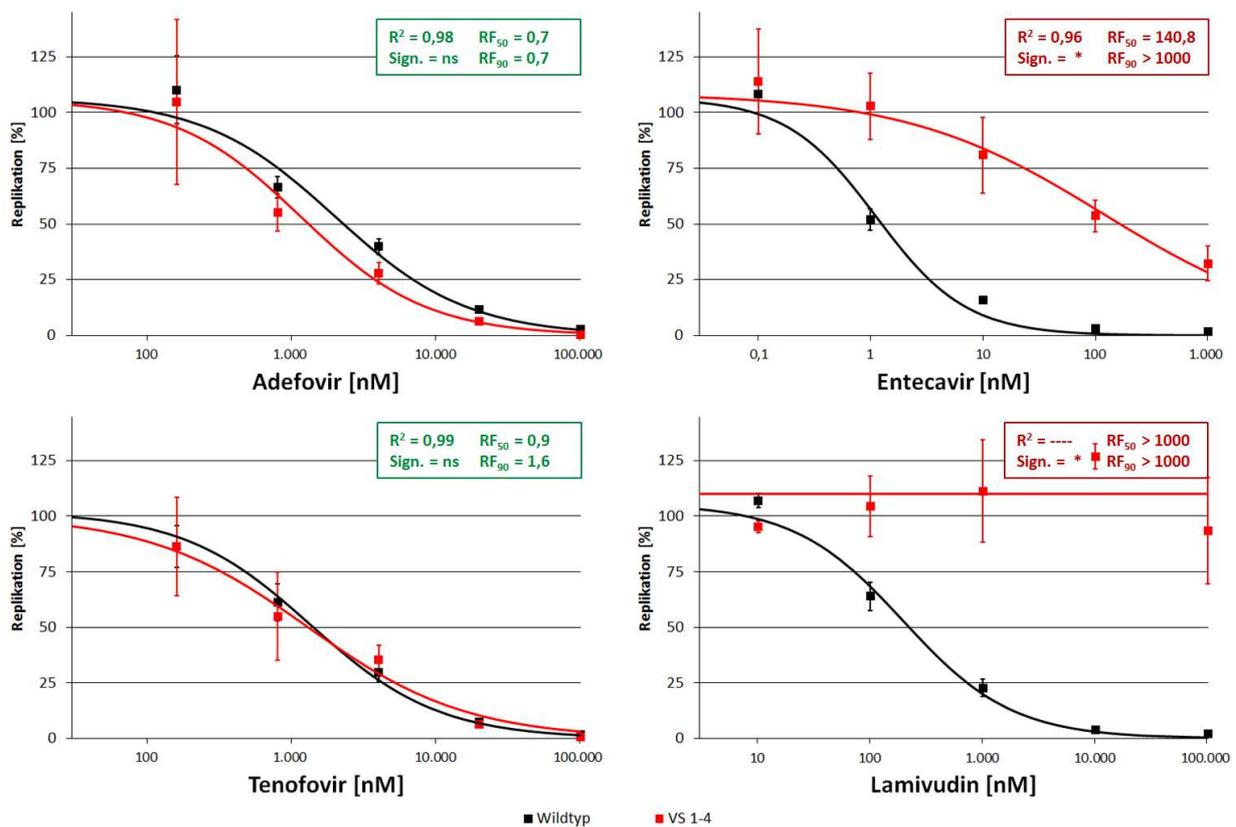


Abbildung 3.11: Resistenzprofil des HBV-Isolats VS 1-4 mit den Mutationen rtL180M + rtM204V. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogons in nM des Isolats VS 1-4 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Als Beispiel für ein Resistenzprofil mit der Primärmutation rtM204I sind in Abbildung 3.12 die Inhibitionskurven des Isolats BW 108-5 gezeigt. Die Lamivudinresistenz war mit der des Isolats VS 1-4 mit der Primärmutation rtM204V vergleichbar. Die Resistenz lag auch hier außerhalb des quantifizierbaren Bereichs des Assays. Eine Adefovir- oder Tenofovirresistenz wurde nicht festgestellt. Mit einem RF_{50} von nur 4,4 konnte lediglich eine geringe Resistenz gegen Entecavir festgestellt werden. Im Vergleich zum Isolat VS 1-4 (Abbildung 3.11) zeigte dies die relativ starken Schwankungen der Entecavirresistenzen innerhalb aller Lamivudin-Resistenzmuster (Tabelle 3.3). Der RF_{50} der meisten Isolate lag im Bereich von 5 bis 50. Drei Isolate wiesen einen RF_{50} von über 100 auf. Für das Isolat VS 2-10 wurde sogar ein RF_{50} von 884,1 gemessen. Wie bereits für das Isolat VS 1-4 beschrieben, fiel die Replikation mit steigender Entecavirkonzentration im Vergleich zum Wildtyp langsamer ab. Der im Vergleich zum RF_{50} fast 30-mal höhere RF_{90} verdeutlichte diese Beobachtung. Dieser im Vergleich zum Wildtyp flachere Verlauf der Inhibitionskurve wurde bei 80 % der getesteten Isolate festgestellt. Nur 3 von 15 Isolaten zeigten eine Differenz zwischen dem RF_{50} und RF_{90} , die kleiner als 10 war (Tabelle 3.3).

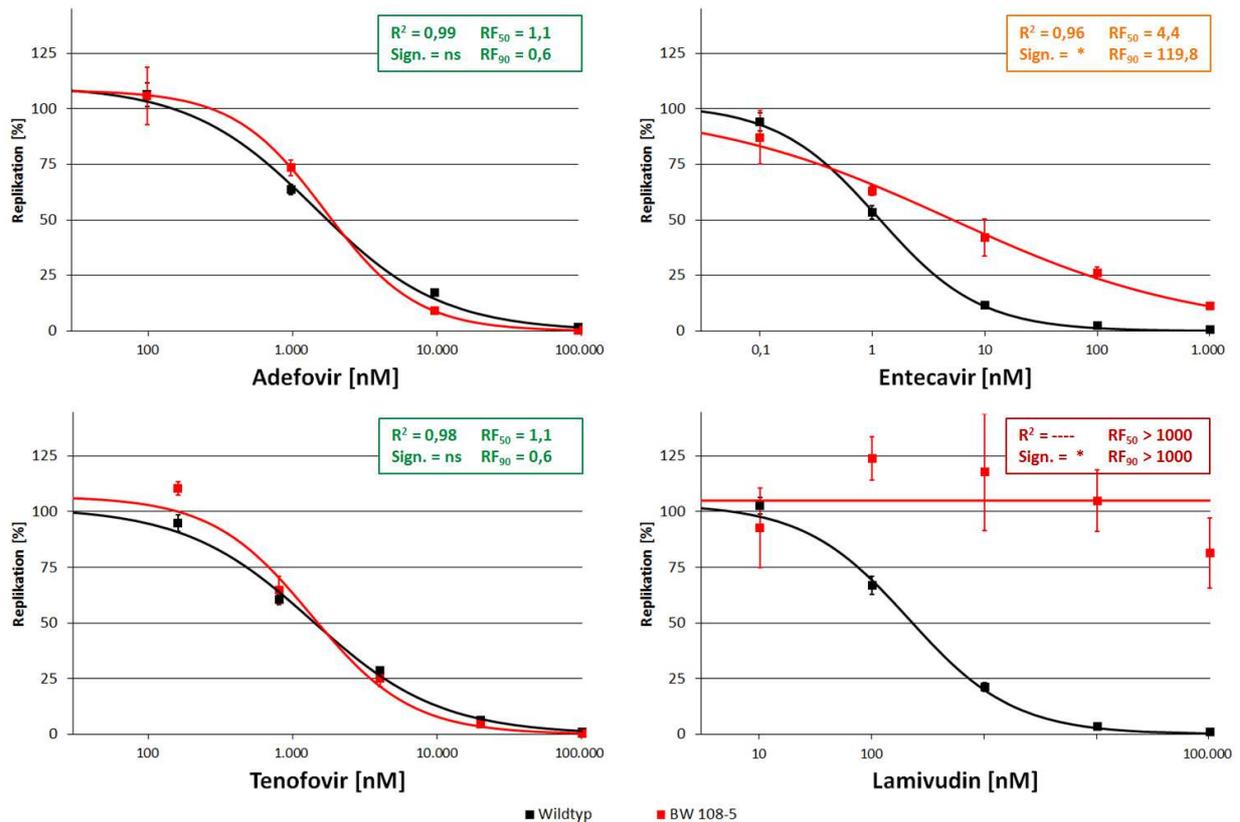


Abbildung 3.12: Resistenzprofil des HBV-Isolats BW 108-5 mit den Mutationen rtL80I + rtM204I. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogs in nM des Isolats BW 108-5 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Auffällig waren die Isolate MS 19-2, VS 1-2, VS 2-10, da diese eine signifikante Resistenz gegen Adefovir zeigten, obwohl sie keine klassischen Adefovir-Resistenzmutationen zeigten. Das Isolat VS 2-12 zeigte eine schwache Resistenz gegen Tenofovir. Das restliche Resistenzprofil entsprach bei allen vier Isolaten dem der übrigen Isolate mit Lamivudin-Resistenzmuster. Als Beispiel sind die Adefovir- und Tenofovir-Inhibitionskurven der Isolate MS 19-2 und VS 2-10 in Abbildung 3.13 dargestellt.

Die Isolate mit der Mutation rtL80I/V hatten im Durchschnitt eine höhere replikative Fitness als die restlichen charakterisierten Isolate. Hier fiel das Isolat BW 113-5 mit einer Fitness von 254 % besonders auf. Ansonsten ließ sich kein Einfluss der Mutationsmuster auf die Fitness feststellen. Auch in Bezug auf den Genotyp konnte weder ein Einfluss auf die Fitness noch auf die Resistenzen festgestellt werden (Tabelle 3.3).

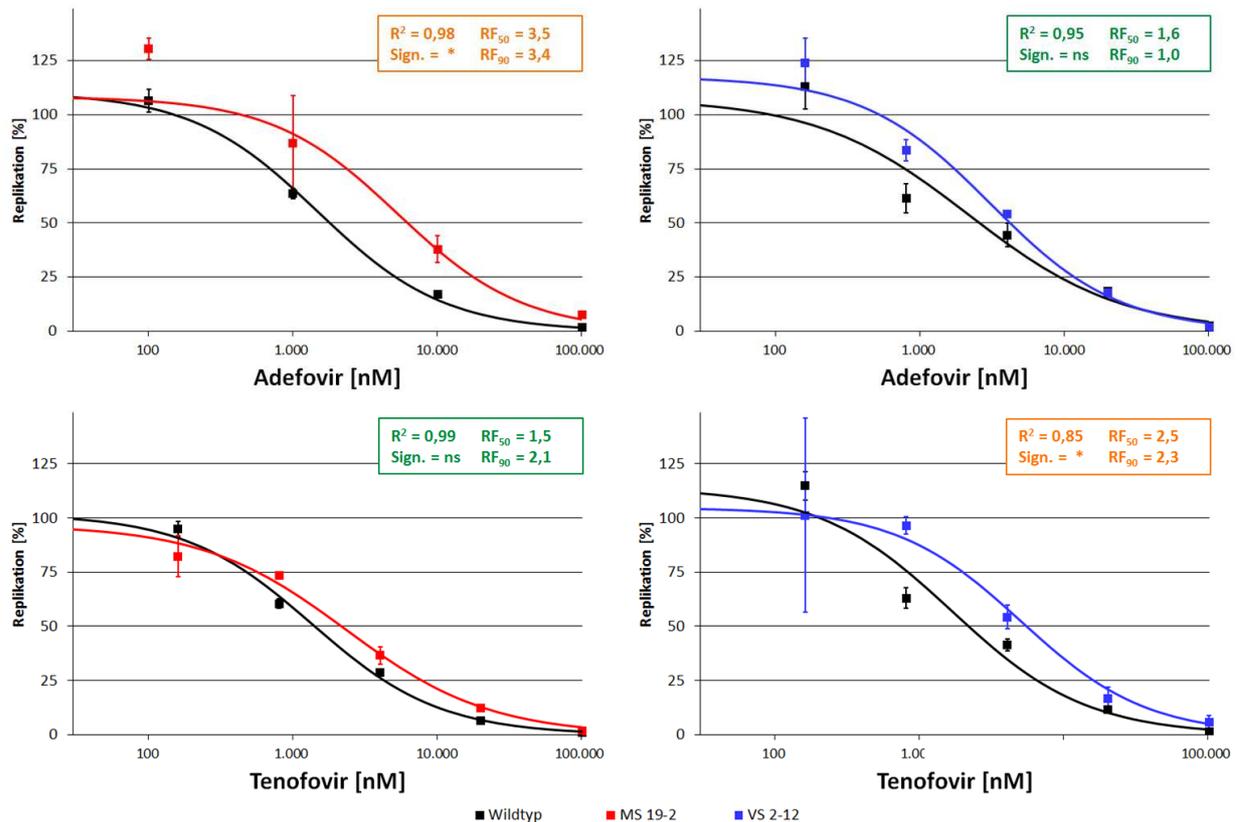


Abbildung 3.13: Adefovir- und Tenofovir-Resistenzprofile der HBV-Isolate MS 19-2 mit den Mutationen *rtV173L* + *rtL180M* + *rtM204V* und VS 2-12 mit der Mutation *rtM204I* Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogons in nM der Isolate MS 19-1 (rot) und VS 2-12 (blau) sowie des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

3.4.4 HBV-Isolate mit Entecavir-Resistenzmutationen

Es wurden lediglich zwei Isolate mit einem klassischen Entecavir-Resistenzmuster im Rahmen dieser Arbeit getestet (Tabelle 3.4). Beide Isolate wiesen ein typisches Lamivudin-Resistenzmuster mit der Primärmutation *rtM204V* auf. Zusätzlich hatte ein Isolat die Mutation *rtS202G* und das andere Isolat die Mutation *rtI169L*. Aufgrund dieser Mutationen wurden sie nicht den Isolaten mit Lamivudin-Resistenzmutationen zugeordnet. Beide Isolate zeigten eine starke Lamivudin- und Entecavirresistenz, eine schwache Tenofovirresistenz aber keine signifikante Resistenz gegen Adefovir. Die replikative Fitness beider Isolate war ähnlich der des Wildtypkonstrukts.

Das Isolat RK 194-5 (Abbildung 3.14) hatte neben der hohen Lamivudinresistenz eine sehr hohe Entecavirresistenz mit einem RF_{50} von ca. 1.800 nM. Dieser Wert lag knapp außerhalb des verwendeten Konzentrationsbereiches und musste daher anhand des Regressionsmodells extrapoliert werden. Der RF_{90} konnte nicht mehr zuverlässig bestimmt werden. Die Entecavirresistenz war damit 20-mal höher als bei Lamivudin-Resistenzmustern (Tabelle 3.3) ohne die *rtS202G*. Außerdem wurde eine schwache Resistenz gegen Tenofovir detektiert. Die Tendenz zu einer Adefovirresistenz war mit Resistenzfaktoren von 2,2 nicht signifikant.

Tabelle 3.4: HBV-Isolate mit Entecavir-Resistenzmutation. Angegeben sind die bekannten Resistenzmutationen in der Reversen Transkriptase, der Genotyp (GT), die replikative Fitness (F) in % relativ zum Wildtyp und für die Resistenzen gegen die Nukleos(t)analoge das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Inhibitionskurve sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz (Sign.) des Unterschieds zum Wildtyp. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Isolat	Mutationen	G T	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin		F [%]
			RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	
			Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	
RK 194-5	L180M + S202G + M204V	D	2,2	2,2	3,6	1,8	~1800	>1000	>1000	>1000	110
			ns	0,93	*	0,99	*	0,86	*	----	
MS 18-3	I169L + V173L + L180M + M204V	D	0,8	0,9	3,8	1,3	105,9	>1000	>1000	>1000	94
			ns	0,99	*	1,00	*	0,91	*	----	

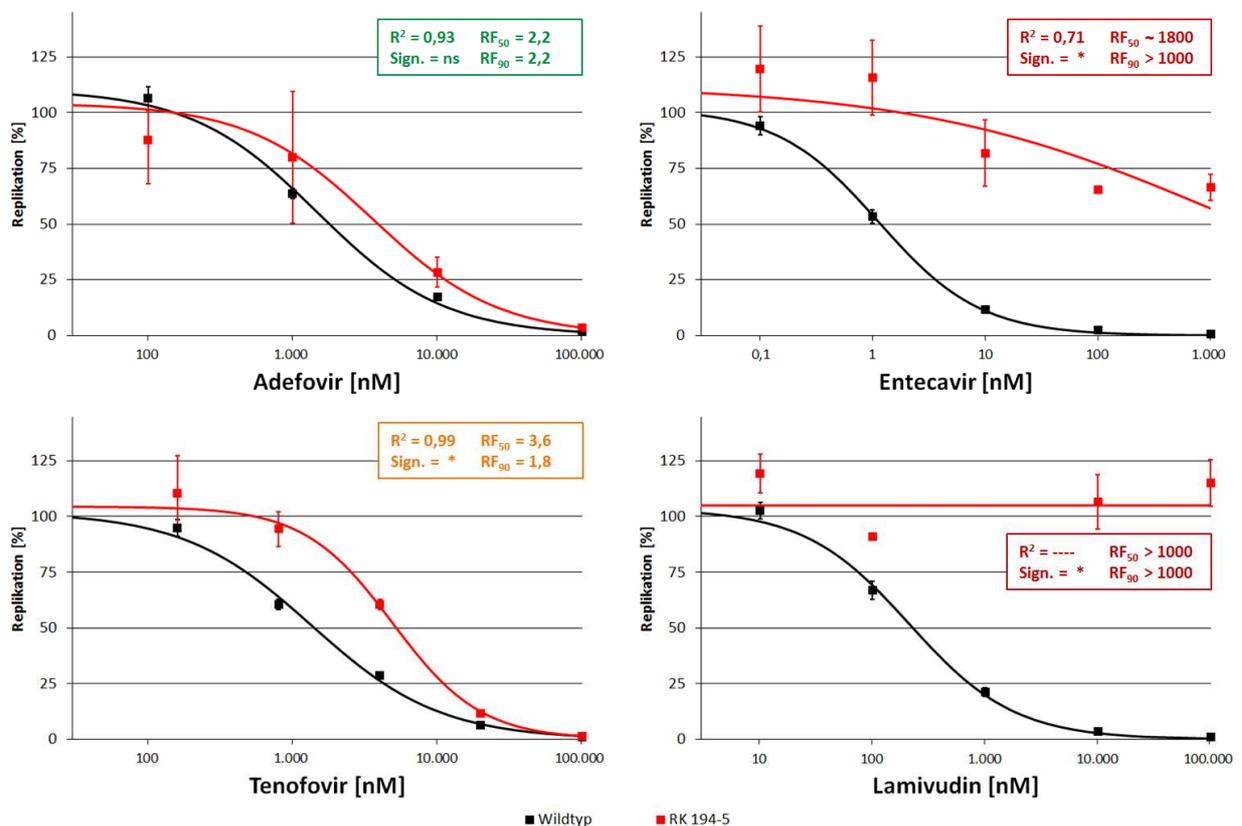


Abbildung 3.14: Resistenzprofil des HBV-Isolats RK 194-5 mit den Mutationen rtL180M + rtS202G + rtM204V. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogons in nM des Isolats RK 194-5 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Im Gegensatz zum Isolat RK 194-5 zeigte das Isolat MS 18-3 keine erhöhte Entecavirresistenz (Abbildung 3.15). Mit einem RF_{50} von 105,6 lag diese im oberen Bereich der Isolate mit der Primärmutation rtM204V (Tabelle 3.3). Das Isolat zeigte eine hohe Lamivudinresistenz. Eine Resistenz gegen Adefovir wurde nicht gemessen, jedoch zeigte das Isolat ebenfalls eine schwache Tenofovirresistenz.

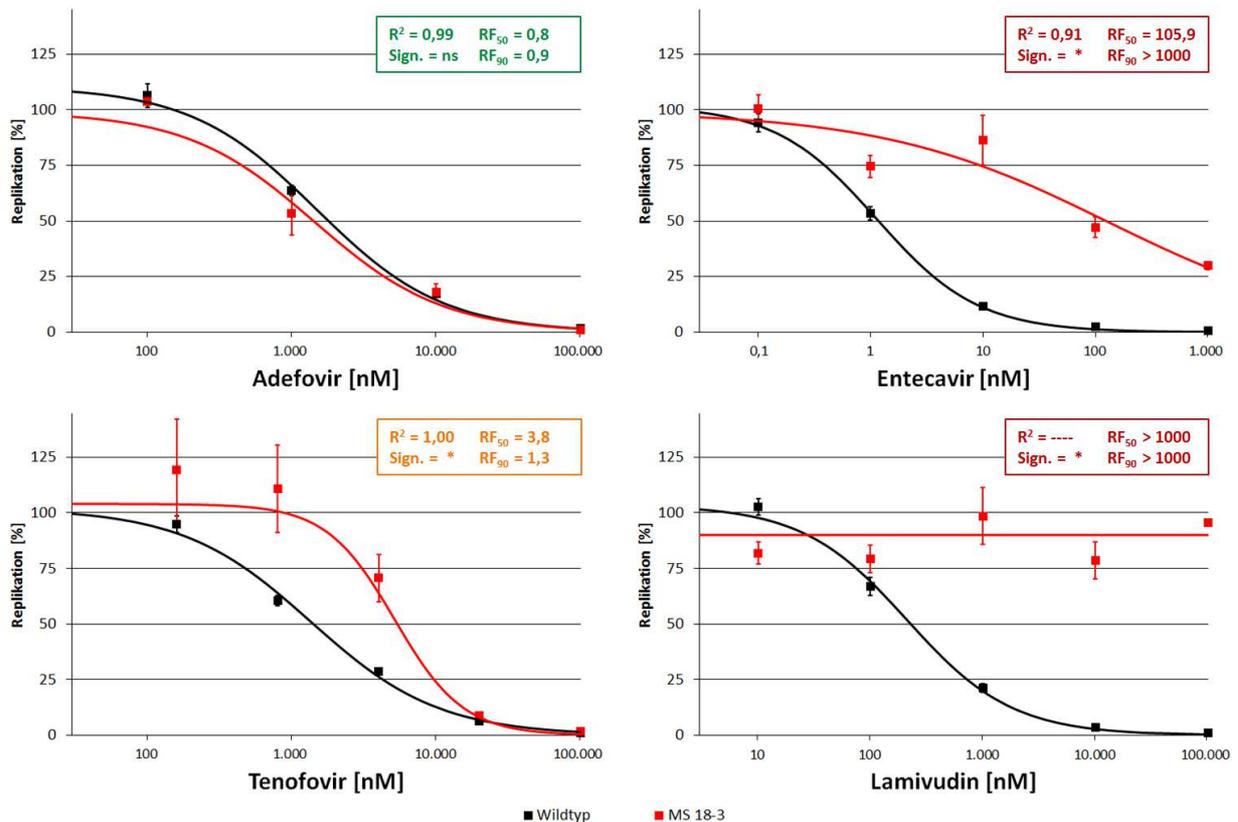


Abbildung 3.15: Resistenzprofil des HBV-Isolats MS 18-3 mit den Mutationen *rtI169L* + *rtV173L* + *rtL180M* + *rtM204V*. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogons in nM des Isolats MS 18-3 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

3.4.5 HBV-Isolate mit Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen

Es wurden vier HBV-Isolate mit Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen getestet (Tabelle 3.5). Drei Isolate enthielten eine Mutation an der Position *rtA181*, wobei ein Isolat mit der Mutation *rtA181T* zusätzlich die Mutation *rtA194V* enthielt. Außerdem wurde ein Isolat mit den Mutationen *rtN236T* und *rtM250L* getestet. Alle Isolate zeigten eine geringe replikative Fitness, wobei diese beim Isolat FvB 170-3 mit 25 % noch am höchsten war.

Die beiden Isolate mit der Mutation *rtA181T* zeigten lediglich eine Resistenz gegen Lamivudin. Anhand der leicht erhöhten Resistenzfaktoren ist eine Tendenz in Richtung Adefovirresistenz zu erkennen. Diese Resistenz war jedoch bei beiden Isolaten nicht signifikant. Als Beispiel sind die Inhibitionskurven des Isolats RK 22-20 in Abbildung 3.16 gezeigt.

Tabelle 3.5: HBV-Isolate mit Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen. Angegeben sind die bekannten Resistenzmutationen in der Reversen Transkriptase, der Genotyp (GT), die replikative Fitness (F) in % relativ zum Wildtyp und für die Resistenzen gegen die Nukleos(t)analoge das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Inhibitionskurve sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz (Sign.) des Unterschieds zum Wildtyp. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Isolat	Mutationen	G T	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin		F [%]
			RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	RF_{50}	RF_{90}	
			Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	
RK 22-15	A181T	D	2,1	4,2	1,7	2,5	0,4	6,7	341,6	----	3
			ns	0,93	ns	0,97	ns	1,00	*	0,79	
FvB 170-3	A181V	D	5,5	9,3	5,0	3,7	14,6	20,8	26,5	94,4	25
			*	0,99	*	0,99	*	0,98	*	0,95	
BW 121-5	N236T + M250L	D	0,9	1,8	2,4	3,1	1,8	23,6	52,2	>1000	1
			ns	0,95	ns	0,99	*	0,95	*	0,97	
RK 22-20	A181T + A194V	D	1,7	2,4	1,5	1,9	0,4	0,2	3,1	3,9	7
			ns	0,96	ns	0,99	ns	1,00	*	0,99	

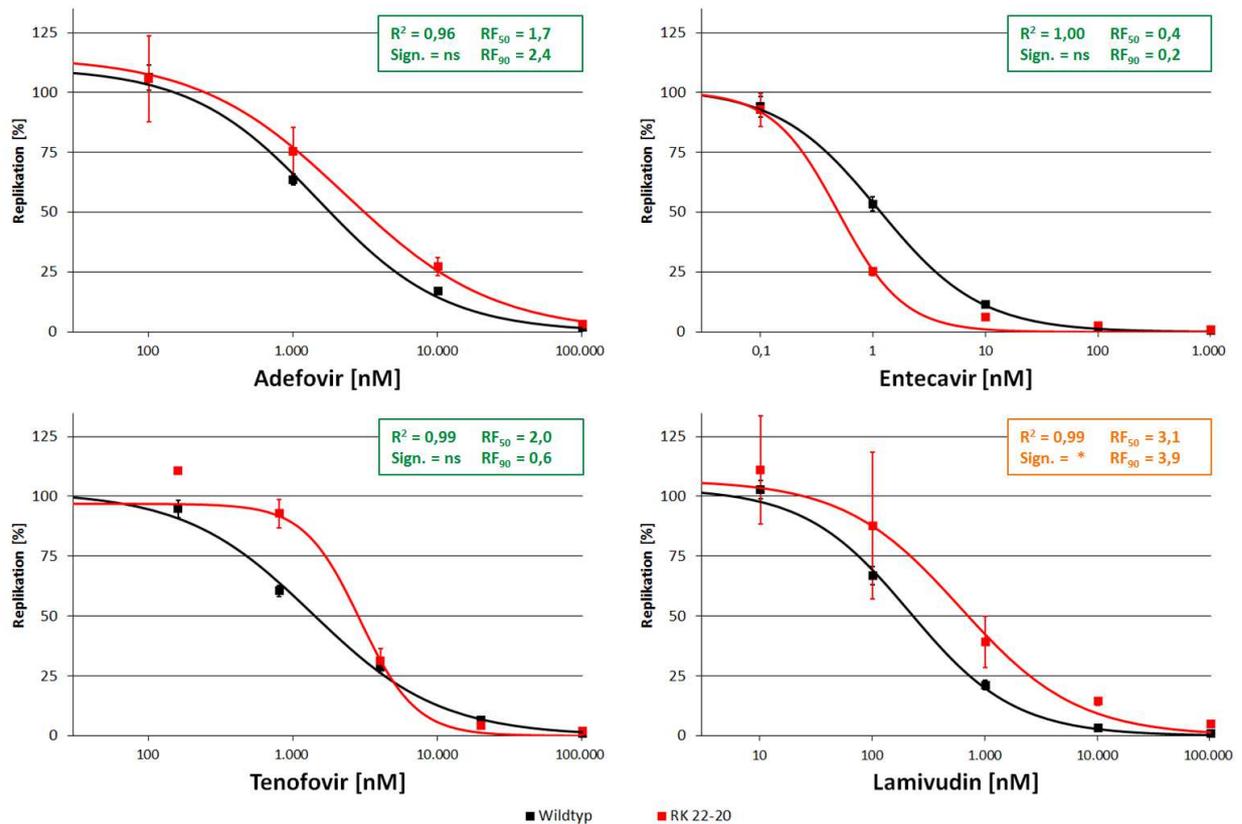


Abbildung 3.16: Resistenzprofil des HBV-Isolats RK 22-20 mit den Mutationen rtA181T + rtA194V. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogons in nM des Isolats RK 22-20 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Das Isolat BW 121-5 (Abbildung 3.17) mit den Mutationen rtN236T und rtM250L zeigte ebenfalls eine Tendenz zu einer Tenofovirresistenz. Ein signifikanter Unterschied war jedoch weder bei Tenofovir noch bei Adefovir festzustellen. Dafür wies dieses Isolat eine leichte aber signifikante Entecavirresistenz und eine mittlere Lamivudinresistenz auf.

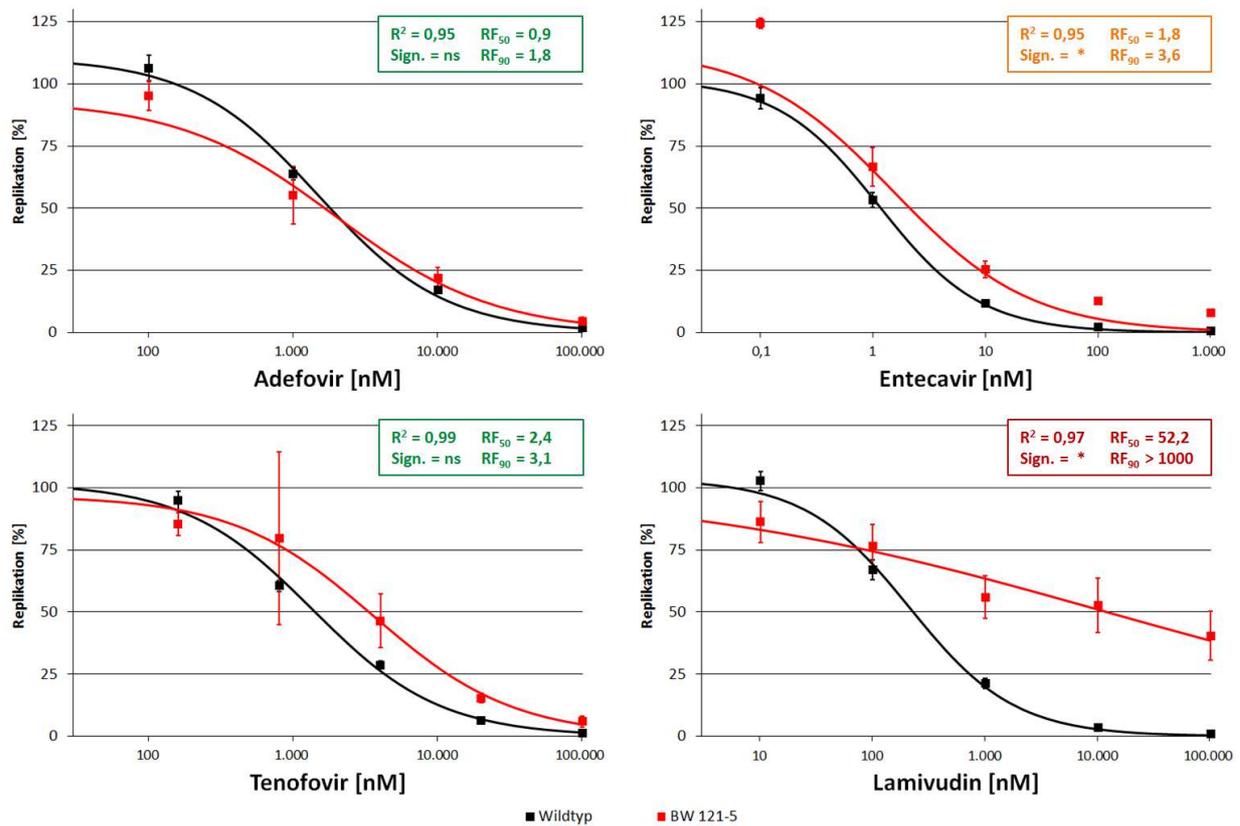


Abbildung 3.17: Resistenzprofil des HBV-Isolats BW 121-5 mit den Mutationen rtN236T + rtM250L. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogons in nM des Isolats BW 121-5 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Das Isolat FvB 170-3 (Abbildung 3.18) mit der Mutation rtA181V zeigte dagegen eine signifikante Resistenz gegen alle vier getesteten Nucleos(t)idanaloga. Mit RF_{50} -Werten von 5,5 und 5,0 hatte dieser Klon die höchsten im Rahmen des HOPE-Projekts in dieser Arbeit gemessenen Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir. Das Isolat wies ebenfalls eine mittlere Entecavirresistenz auf. Der RF_{90} unterschied sich kaum vom RF_{50} , daher ist in Abbildung 3.18 auch ein paralleler Verlauf der Inhibitionskurve im Vergleich zur Wildtypkurve zu sehen. Die gemessene Lamivudinresistenz war deutlich niedriger als bei den Primärmutationen rtM204I/V.

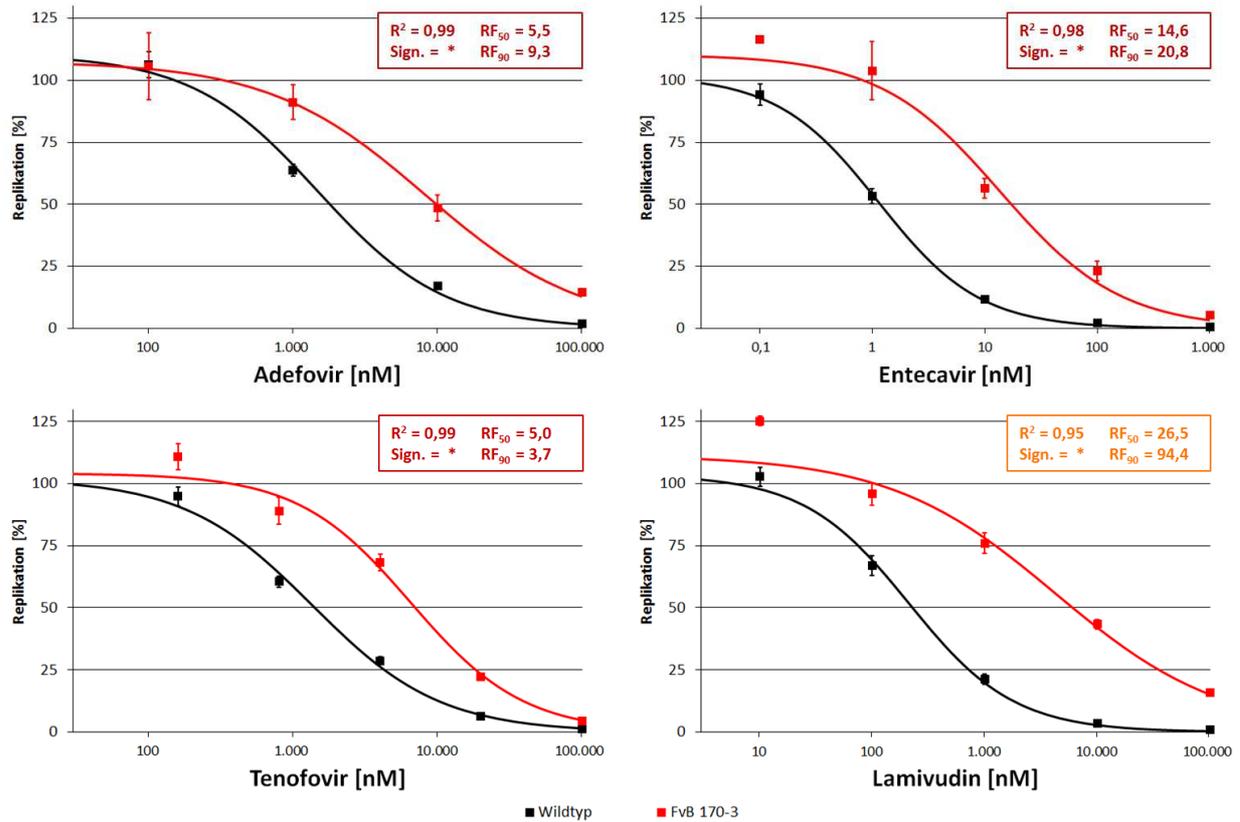


Abbildung 3.18: Resistenzprofil des HBV-Isolats FvB 170-3 mit der Mutation rtA181V. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleos(t)idanalogs in nM des Isolats FvB 170-3 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF_{50} und RF_{90}) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, $ns \triangleq$ nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

3.4.6 HBV-Isolat mit einer Insertion in der Reversen Transkriptase

Es wurde ein HBV-Isolat mit den Mutationen rtI169S und rtA181S gefunden, das zusätzlich eine Insertion der Aminosäuren Serin, Lysin; Lysin, Cystein und Isoleucin zwischen den Aminosäuren 118 und 119 der Reversen Transkriptase aufwies (Tabelle 3.6 und Abbildung 3.19). Im überlappenden S-ORF ergab sich dadurch jedoch kein Stoppcodon. Dieses spezielle Isolat war trotz der Insertion replikationsfähig und zeigte lediglich eine leichte Resistenz gegen Lamivudin. Für die Nucleos(t)idanaloga Adefovir, Tenofovir und Entecavir ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Die replikative Fitness lag im Vergleich zu den restlichen charakterisierten Isolaten mit 17 % im eher niedrigen Bereich.

Tabelle 3.6: HBV-Isolat mit einer HBV-Insert zwischen den Aminosäuren 118 und 119. Angegeben sind die bekannten Resistenzmutationen in der Reversen Transkriptase, der Genotyp (GT), die Fitness (F) in % relativ zum Wildtyp und für die Resistenzen gegen die Nukleos(t)analoge das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Inhibitionskurve sowie die Resistenzfaktoren (RF₅₀ und RF₉₀) und die Signifikanz (Sign.) des Unterschieds zum Wildtyp. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

Isolat	Mutationen	G T	Adefovir		Tenofovir		Entecavir		Lamivudin		F [%]
			RF ₅₀	RF ₉₀							
			Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	Sign.	R^2	
BW 111-3	118-SKKCI-119 + I169L + A181S	D	3,1 ns	1,7 0,93	1,9 ns	2,2 0,97	1,0 ns	3,5 1,00	4,4 *	19,3 0,82	17

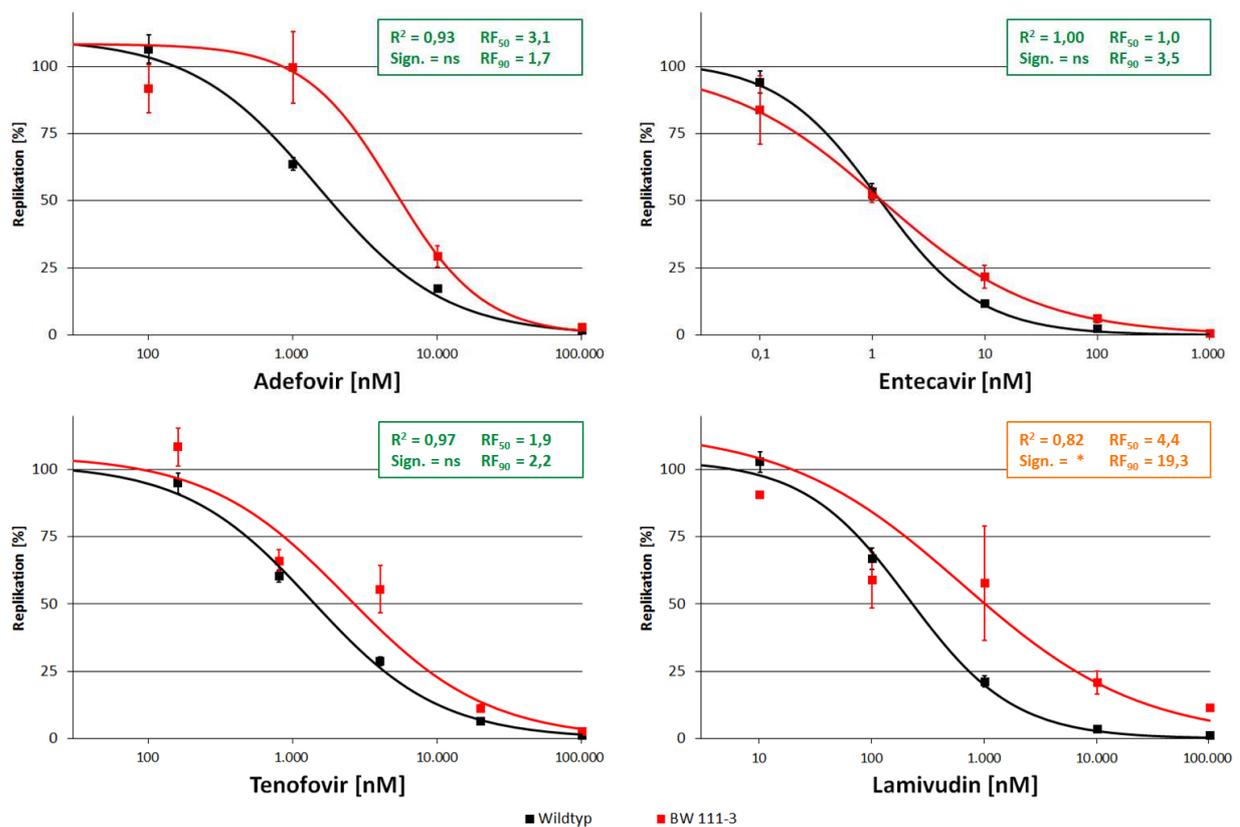


Abbildung 3.19: Resistenzprofil des HBV-Isolats BW 111-3 mit der Insertion rt1188-SKKCI-119 und den Mutationen rtI169L + rtA181S. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nukleos(t)idanalogs in nM des Isolats BW 111-3 (rot) und des Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Resistenzfaktoren (RF₅₀ und RF₉₀) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

3.4.7 Ringstudie zur Verifizierung des phänotypischen Assays

Im Rahmen einer kleinen Ringstudie mit der ebenfalls am HOPE-Projekt beteiligten Arbeitsgruppe von Prof. U. Protzer (TU München) sollten die ermittelten Ergebnisse wechselseitig verifiziert werden. Dazu wurden durch ortsspezifische Mutagenese erzeugte Klone (pCH9-3091) mit typischen Resistenzmutationen in der Reversen Transkriptase der HBV-Polymerase von der AG Protzer zur Verfügung gestellt. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit in den phänotypischen Assay zur

Resistenzbestimmung eingesetzt. Tabelle 3.7 zeigt neben den eingefügten Mutationen auch den Grund für die Auswahl der Klone für die Ringstudie (Auffälligkeit).

Die Phänotypisierung im Rahmen dieser Arbeit ergab für elf der 15 zu verifizierenden Resistenzfaktoren keine relevante Abweichung zu den Ergebnissen der AG Protzer. Die Abweichung von neun Resistenzfaktoren war geringer als 40 %. Die anderen beiden wichen um weniger als das Zweifache ab. Damit konnte der Großteil der Ergebnisse des Projektpartners bestätigt werden.

Einige Ergebnisse der AG Protzer konnten jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 3.20). Statt der unerwartet hohen Tenofovirresistenz der Isolate MUC 01 und MUC 16 wurde im Rahmen dieser Arbeit keine Resistenz gemessen. Beide Klone hatten die sekundäre Lamivudin-Resistenzmutation rL80I, der Klon MUC 16 hatte zusätzlich auch die Primärmutation rtM204I. Die Phänotypisierung der Klone MUC 18 und MUC 20 ergab eine drei- bis fünffach geringere Resistenz gegen Tenofovir als von der AG Protzer ermittelt. Beide Klone hatten ein Lamivudin-Resistenzmuster auf der Grundlage der Primärmutation rtM204V. Die für den Klon MUC 37 ermittelte Adefovirresistenz war lediglich halb so stark wie zuvor in München gemessen. Dieser Klon hatte die Mutationen rL180M und rtN236T. Diese Kombination wurde im Rahmen dieser Arbeit in keinem Patientenisolat gefunden. Die in München aufgefallene hohe Varianz in den Daten des Klons MUC 38 konnte nicht beobachtet werden. Die Adefovir- und Tenofovirresistenz wurde jedoch bestätigt.

Tabelle 3.7: Ringstudie mit durch ortsspezifische Mutagenese generierten Klonen aus München. Angeben sind die eingefügten Mutationen in der Reversen Transkriptase, das verwendete Nukleos(t)idanalogen (NA,) und der Grund für die Auswahl des Klons für die Ringstudie (Auffälligkeit). Für die von der AG Protzer in München ermittelten Resistenzen ist jeweils der ermittelte Resistenzfaktor (RF₅₀) zum Wildtyp angegeben. Zu den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten RF₅₀ sind außerdem das Bestimmtheitsmaß (R²) der Regression sowie die Signifikanz (Sign) der Resistenz angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt * $\triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) sowie erhöhte Suszeptibilität (blau) unterteilt. Die voneinander abweichenden Resistenzfaktoren sind fett dargestellt. Die Daten aus München wurden freundlicherweise von Prof. U. Protzer (TU München) zur Verfügung gestellt.

Klon	Mutationen	NA	München (RF-Werte und Analyse)		in dieser Arbeit ermittelt		
			Auffälligkeit	RF ₅₀	RF ₅₀	Sign.	R ²
MUC 01	L80I	Tenofovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	6,0	0,6	ns	0,99
MUC 05	A181V	Adefovir	Ausreißer	0,7	0,9	ns	0,98
		Tenofovir	Ausreißer	0,8	1,4	ns	0,98
MUC 11	M204V	Adefovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	11,0	8,3	*	0,83
		Tenofovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	14,4	8,0	*	0,97
MUC 12	M204I	Entecavir	Ausreißer	147,3	106,7	*	0,92
MUC 16	L80I + M204I	Tenofovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	11,7	0,7	ns	0,99
MUC 18	L180M + M204I	Entecavir	RF ₅₀ unerwartet hoch	251,2	184,1	*	0,86
		Tenofovir	Ausreißer	11,9	2,3	*	0,96
MUC 20	L180M + M204V	Tenofovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	13,5	5,3	*	0,99
MUC 21	M173L + L180M + M204V	Entecavir	Ausreißer	63,0	52,9	*	0,90
MUC 29	L180M + T184G + M204V	Adefovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	9,0	7,0	*	0,89
MUC 37	L180M + N236T	Adefovir	RF ₅₀ unerwartet hoch	18,0	9,3	*	1,00
MUC 38	A181V + N236T	Adefovir	hohe Varianz	3,3	3,4	*	0,99
		Tenofovir	hohe Varianz	3,9	3,7	*	0,93

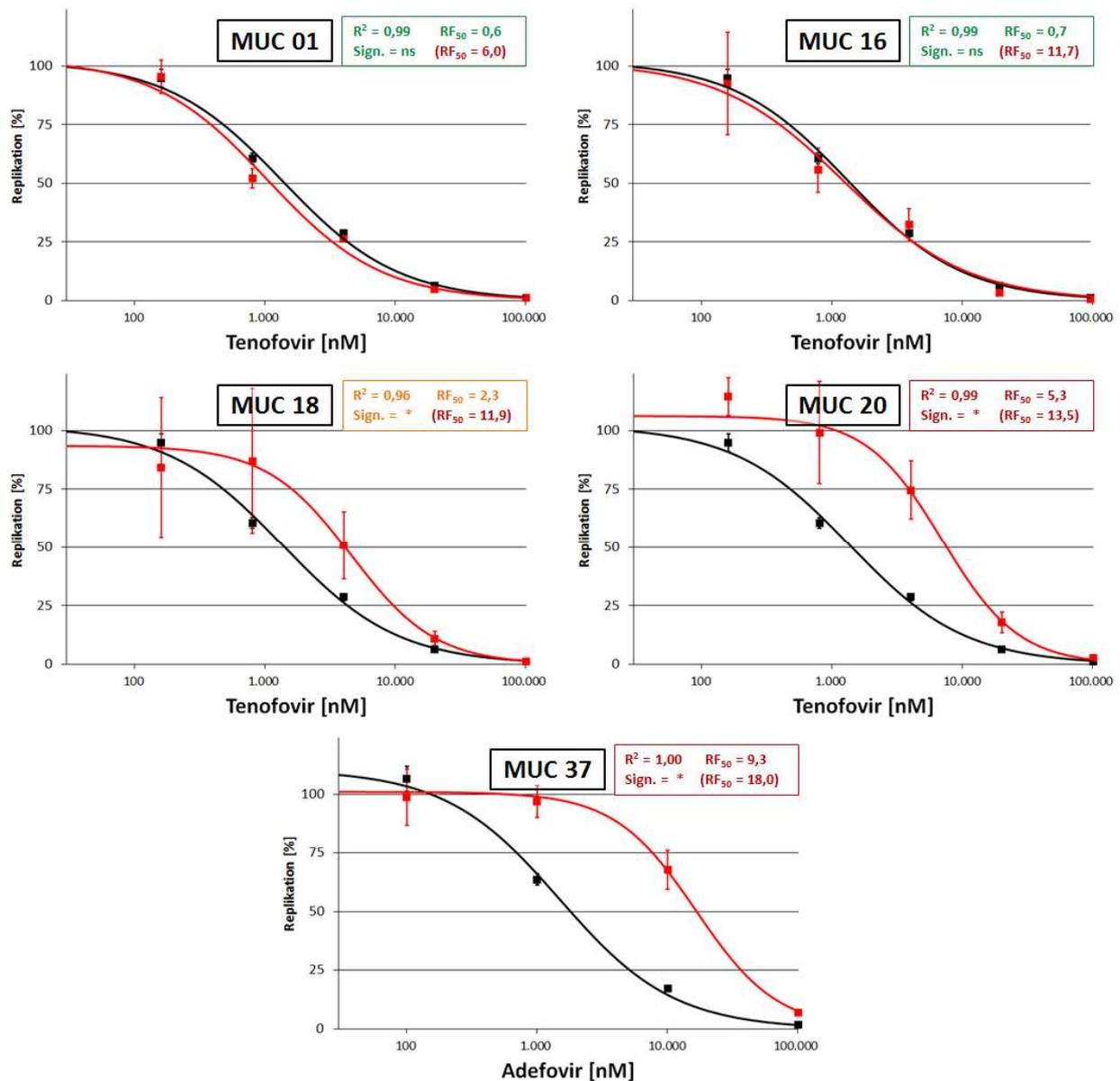


Abbildung 3.20: Ausgewählte Resistenzprofile der Ringstudie. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Nucleotidanalogs in nM der Klone (rot) MUC 01 (rtL80I), MUC 16 (rtL50I + rtM204I), MUC 18 (rtL180M + rtM204I), MUC 20 (rtL180M + rtM204V) und MUC 37 (rtL180M + rtN236T) sowie des jeweiligen Wildtyps (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die RF_{50} aus Gießen (ohne Klammer) und die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp sind jeweils in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierte Signifikanzgrenze beträgt $* \triangleq p < 1 \times 10^{-3}$, ns \triangleq nicht signifikant. Zusätzlich ist der von der AG Protzer ermittelte RF_{50} in Klammern angegeben. Die Stärke der Resistenz ist in keine (grün), schwach (orange) und stark (rot) unterteilt.

3.5 Charakterisierung neuer potentieller Resistenzmutationen

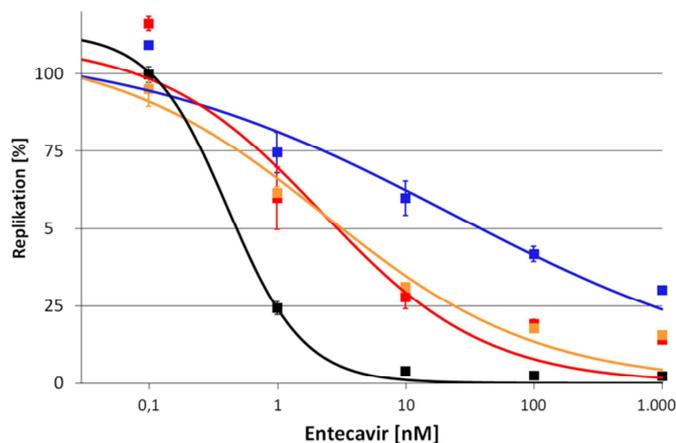
Der für das HOPE-Projekt entwickelte phänotypische Assay zur Resistenzbestimmung wurde auch für die Charakterisierung von HBV-Mutanten außerhalb des Projektes verwendet. In einer Publikation von Cento et al. (2013) wurden Mutationen beschrieben, die signifikant gehäuft in Patienten unter der Therapie mit Nucleos(t)idanaloga beobachtet wurden. Mit Hilfe des phänotypischen Assays zur Resistenzbestimmung sollte nun der tatsächliche Einfluss dieser Mutationen auf die Resistenz *in vitro* überprüft werden. Ausgewählte Mutationen wurden dafür mittels ortsspezifischer Mutagenese (2.2.10) in

das Wildtypkonstrukt pCH9-3091 eingefügt und die Resistenz gegen das entsprechende Nukleos(t)idanalogen bestimmt (2.2.16).

3.5.1 Einfluss der Mutationen rtL229F/V auf die Resistenzentwicklung

Die Mutationen rtL229F und rtL229V wurden gehäuft in Lamivudin-behandelten Patienten gefunden. Beide Mutationen traten jedoch ausschließlich zusammen mit den Mutationen rtL180M und rtM204V auf und sollten daher auch in Kombination mit diesen beiden Mutationen getestet werden. Die Primärmutation rtM204V verursacht jedoch alleine bereits eine IC_{50} außerhalb des Lamivudin-Konzentrationsbereiches des phänotypischen Assays. Aus diesem Grund wäre ein zusätzlicher Effekt der Mutationen rtL229F/V nicht zu sehen gewesen. Lamivudinresistenzen führen jedoch zu einer Kreuzresistenz gegen Entecavir, daher wurden die Mutationen rtL229F/V stattdessen gegen Entecavir getestet.

Der Klon mit den Mutationen rtL180M und rtM204V führte zu einem Resistenzfaktor von 79,4. Enthielt das Konstrukt zusätzlich zu den beiden Mutationen noch eine Mutation an der Position rtL229, wurde eine 12- bis 13-fach geringere Entecavirresistenz gemessen (Abbildung 3.21). Ein Unterschied in der replikativen Fitness konnte dagegen nicht festgestellt werden. Diese betrug für die Mutationen rtL180M und rtM204V 15 % und zusammen mit der Mutation rtL229F/V 20 bzw. 21 %.



Mutationen	Entecavir		Signifikanz
	R ²	RF ₅₀	
Wildtyp	0,98	1,0]***]***]***
rtL180M + rtM204V	0,90	79,4	
rtL180M + rtM204V + rtL229V	0,93	6,1	
rtL180M + rtM204V + rtL229F	0,97	6,6	

Abbildung 3.21: Einfluss der Mutationen rtL229V und rtL229F auf die Entecavirresistenz. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Entecavirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), der Lamivudin-Resistenzmutationen rtL180M + rtM204V alleine (blau) sowie in Kombination mit den Mutationen rtL229V (rot) und rtL229F (orange). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Regressionskurven. Die Bestimmtheitsmaße (R^2), die Resistenzfaktoren (RF_{50}) zum Wildtyp und die Signifikanzen der Unterschiede zu den bekannten Lamivudin-Resistenzmutationen rtL180M + rtM204V sind in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen * $\triangleq p < 8,3 \times 10^{-3}$, ** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-3}$, *** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-4}$, ns \triangleq nicht signifikant.

3.5.2 Einfluss der Mutation rtM309K auf die Resistenzentwicklung

Die Mutation rtM309K wurde in Entecavir-behandelten Patienten ebenfalls ausschließlich zusammen mit den Mutationen rtL180M und rtM204V gefunden. Daher wurde die Kombination aus allen drei Mutationen phänotypisch mit der gut charakterisierten Kombination rtL180M und rtM204V verglichen. Die Mutation rtM309K führte in Kombination mit diesen Mutationen dabei zu keiner signifikanten Änderung der Resistenz. Auch die replikative Fitness der Mutationen rtL180M und rtM204V mit der rtM309K von 9 % unterschied sich kaum von der Fitness der Variante ohne die rtM309K (15 %).

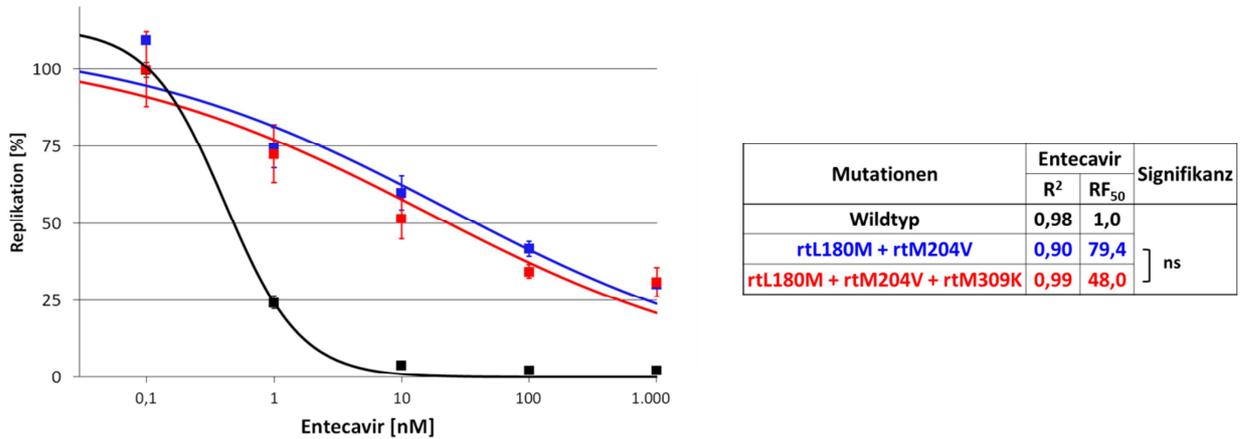


Abbildung 3.22: Einfluss der Mutationen rtM309K auf die Entecavirresistenz. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Entecavirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), der Lamivudin-Resistenzmutationen rtL180M + rtM204V alleine (blau) sowie in Kombination mit der Mutation rtM309K (rot). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Konzentrationsstufen sowie die Inhibitionskurven. Die Bestimmtheitsmaße (R²), die Resistenzfaktoren (RF₅₀) zum Wildtyp und die Signifikanz des Unterschieds der beiden Klone sind in der Box rechts angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen * $\triangleq p < 8,3 \times 10^{-3}$, ** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-3}$, *** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-4}$, ns \triangleq nicht signifikant.

3.5.3 Einfluss der Mutation rtS78T auf die Resistenzentwicklung

Die Mutation rtS78T wurde in Adefovir-behandelten Patienten gefunden. Diese Mutation kam dabei sowohl in Kombination mit der Mutation rtA181V als auch einzeln im Patienten vor und wurde deshalb in beiden Varianten phänotypisiert. Wie in Abbildung 3.23 dargestellt ergaben sich jedoch weder zum Wildtyp noch untereinander signifikante Unterschiede. Auch für die replikative Fitness ergaben sich kaum Unterschiede. Die Fitness der Mutation rtA181V betrug 23 %, die der rtS78T 21 % und die der Kombination aus rtA181V und rtA78T 19 %.

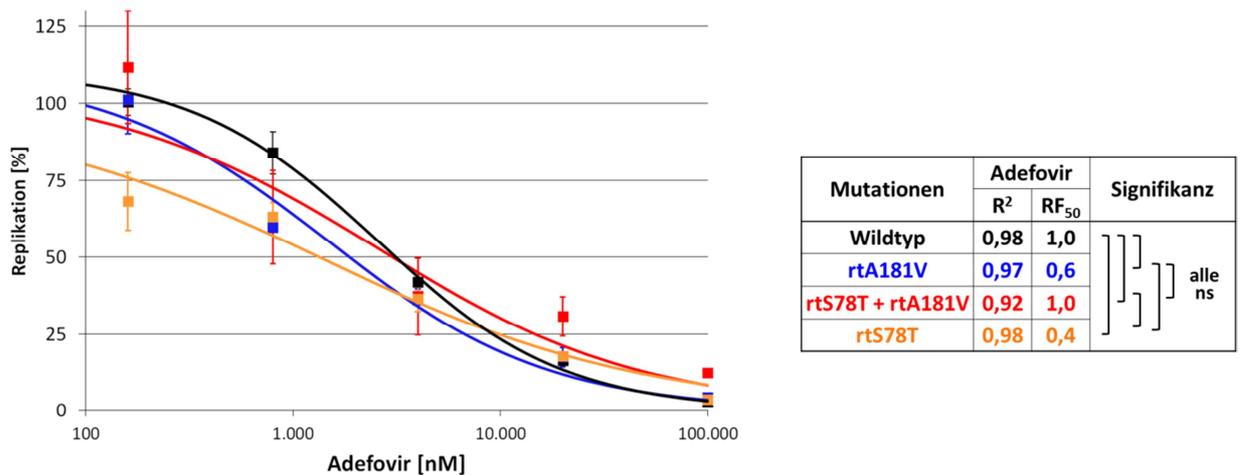


Abbildung 3.23: Einfluss der Mutationen rtS78T auf die Adefovirresistenz. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Adefovirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), der Adefovir-Resistenzmutationen rtA181V alleine (blau), der Kombination aus rtA181V + rtS78T (rot) sowie die Mutation rtS78T alleine (orange). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Konzentrationsstufen sowie die Inhibitionskurven. Die Bestimmtheitsmaße (R²), die Resistenzfaktoren (RF₅₀) zum Wildtyp und die Signifikanz des Unterschieds der beiden Klone sind in der Box rechts angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen * $\triangleq p < 8,3 \times 10^{-3}$, ** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-3}$, *** $\triangleq p < 1,7 \times 10^{-4}$, ns \triangleq nicht signifikant.

3.6 Charakterisierung der HBV-Mutanten des Patienten FvB 150

Im Rahmen des HOPE-Projekts wurde ein multiresistentes HBV-Isolat gefunden (Geipel 2011). Das Isolat FvB 150-1 mit den Mutationen rtA181V und rtN236T zeigte eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir. Die Höhe der Resistenz war mit den bekannten Mutationen nicht zu erklären. Außerdem zeigte das Isolat eine hohe Lamivudinresistenz und eine für diese Mutationen untypische Entecavirresistenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung des Klon im Zusammenhang mit der klinischen Vorgeschichte des Patienten näher betrachtet.

Abbildung 3.24 zeigt den Therapie- und Infektionsverlauf des Patienten FvB 150. Die zugrundeliegenden Daten wurden freundlicherweise von Dr. F. van Bömmel (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt. Die chronische HBV-Infektion wurde zunächst für 39 Monate mit Lamivudin und anschließend für weitere 20 Monate mit Adefovir behandelt. Nachdem es während der Adefovirtherapie jedoch zu einem starken Anstieg des Virustiters auf 1×10^8 GE/ml, was formal einem virologischen Durchbruch einer resistenten Variante entspricht, wurde die Therapie auf das höher dosierbare Nukleotidanalogen Tenofovir umgestellt. Unter Tenofovirtherapie fiel der Virustiter innerhalb von drei Wochen um fast drei Zehnerpotenzen auf ca. 2×10^5 GE/ml ab. Danach blieb der Titer jedoch vorerst auf diesem Niveau und fiel erst nach sechs weiteren Wochen zügig weiter bis auf ca. 3×10^2 GE/ml ab. In den Wochen 18 und 19 der Tenofovirtherapie war ein leichter zwischenzeitiger Anstieg des Virustiters auf ca. 1×10^3 GE/ml zu verzeichnen. In Woche 33 stieg der Titer jedoch sehr stark auf 1×10^5 GE/ml an, um anschließend wieder auf ca. 5×10^3 bis 1×10^4 GE/ml abzufallen. Das ALT-Level (Alanin-Aminotransferase, ein Marker für eine Leberfunktionsstörung) folgte dem Virustiter mit wenig Verzögerung nach. Die Menge HBs-Antigen blieb in etwa konstant. Insgesamt zeigte der Patient damit ein außergewöhnlich langsames und vermindertes Ansprechen auf die Therapie mit Tenofovir.

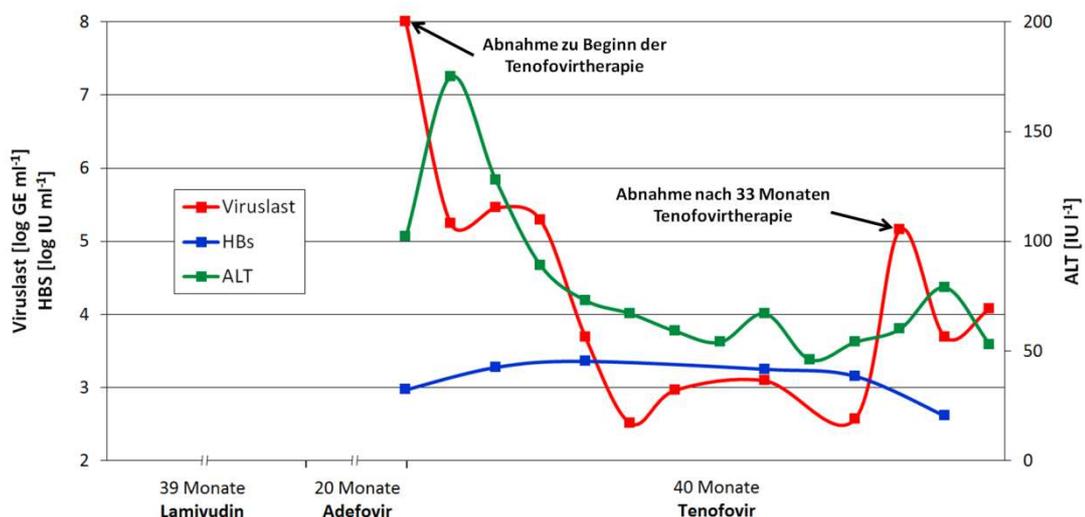


Abbildung 3.24: Verlauf und Therapie der HBV-Infektion des Patienten FvB 150. Dargestellt ist die Viruslast in log GE/ml (rot), die Menge an HBs-Antigen in log IU/ml (blau) und das ALT-Level in IU/l (grün) in Abhängigkeit vom Verlauf der Therapie in Monaten. Der Patient wurde zuerst mit Lamivudin-behandelt. Nach 39 Monate wurde die Therapie auf Adefovir umgestellt und nach weiteren 20 Monate erfolgte ein erneuter Wechsel auf Tenofovir. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Blutabnahmen, deren Quasispezies in dieser Arbeit charakterisiert wurde. Für den Zeitraum der Lamivudin- und Adefovirtherapie lagen keine Daten vor. Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. F. van Bömmel (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt.

3.6.1 Genotypische Charakterisierung der viralen Quasispezies

Für die genotypische Charakterisierung der viralen Quasispezies des Patienten FvB 150 wurden die erste Abnahme unter Tenofovir sowie die Abnahme nach 33 Wochen Tenofovirtherapie ausgewählt. Zum einen wiesen diese Abnahmen einen ausreichenden Virustiter für die Ganzgenomamplifikation auf, zum anderen konnte so der Einfluss der Tenofovirgabe auf die Zusammensetzung der Quasispezies untersucht werden. Die DNA aus beiden Seren wurde aufgereinigt, das Ganzgenom amplifiziert und in den Vektor pCH9-200 kloniert (2.2.11.1). Beide Klonierungen ergaben mehrere Hundert Klone. Von der ersten Abnahme wurden zehn Klone ausgewählt und sequenziert (Abnahme 1, Klon 1-XX). Außerdem wurde das Isolat FvB 150-1 als elfter Klon unter dem Namen 150-1 mit in die genotypische Charakterisierung einbezogen. Dieser Klon lag jedoch nur als klonierte Polymerase im Wildtypkonstrukt des pCH9-3091 und nicht als Ganzgenom vor. Von der Abnahme nach 33 Monaten Tenofovirtherapie wurden elf Klone ausgewählt und ebenfalls sequenziert (Abnahme 2, Klon 2-XX).

3.6.1.1 Phylogenetischer Stammbaum

Die Sequenzen der 22 analysierten Klone wurden für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums genutzt. Der Stammbaum wurde lediglich mit den Polymerasesequenzen erstellt, um auch das ursprüngliche Isolat 150-1 in die Analyse einschließen zu können. Das Wildtypkonstrukt pCH9-3091 diente als Genotyp-spezifische Fremdgruppe. Die Klone gliederten sich dabei in zwei Gruppen (Abbildung 3.25), die im Folgenden als grüne und blaue Gruppe bezeichnet werden. Das Isolat 150-1 fügte sich in die blaue Gruppe ein.

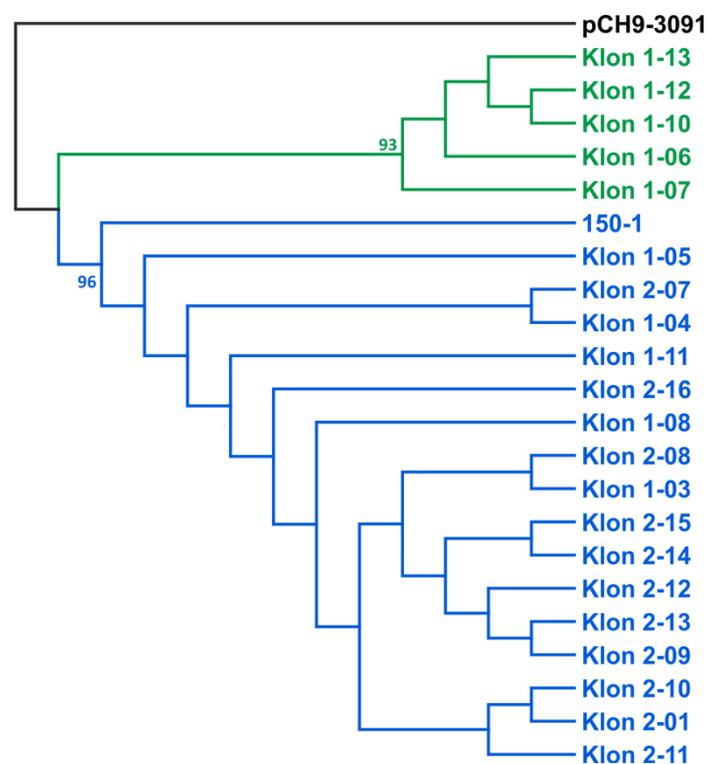


Abbildung 3.25: Phylogenetischer Stammbaum der sequenzierten HBV-Klone des Patienten FvB 150. Die Analyse wurde mit den Sequenzen der Polymerase nach der *Maximum-Likelihood*-Methode mit dem Programm MEGA durchgeführt (Tamura et al. 2011). Die Zahlenwerte geben an wie viel Prozent der mittels Bootstrap errechneten Stammbäume die gleiche Eingruppierung aufwiesen.

3.6.1.2 Polymorphismusanalyse anhand eines Genotyp D Konsensus

Für die weitere Auswertung der sequenzierten Klone des Patienten FvB 150-1 wurde ein Konsensus aus 83 publizierten Aminosäuresequenzen der HBV-Polymerase des Genotyp D gebildet (Norder et al. 2004, Ghosh et al. 2010). Die sequenzierten Klone wurden zur Ermittlung der Mutationen und Polymorphismen mit diesem Konsensus verglichen. Hierbei wurden alle Unterschiede zum Konsensus, die in mehr als 5 % der 83 Sequenzen auftraten, als Polymorphismus definiert. In den Tabellen 3.8 und 3.9 ist eine Übersicht über die Sequenzanalyse der untersuchten Klone gezeigt, wobei für eine bessere Übersichtlichkeit die Polymorphismen nicht dargestellt werden. Eine Übersicht inklusive aller Polymorphismen kann im Anhang eingesehen werden (Tabellen A.4 und A.5).

Die phylogenetischen Gruppen (3.6.1.1) unterschieden sich deutlich in den gefundenen Mutationen der Polymerase. Für die grüne Gruppe waren die Mutationen N45D in der Primerdomäne, R211G, C264G und F310S in der Spacerdomäne sowie die Mutation rtN76D in der Reversen Transkriptase charakteristisch (Tabelle 3.8, grün hinterlegt). Die Mutationen H73N und T76S (Primerdomäne) sowie A273T, A290T und R302K (Spacerdomäne) und außerdem die Mutationen rtR110G und rtT128N in der Reversen Transkriptase waren typisch für die blaue Gruppe (Tabellen 3.8 und 3.9, blau hinterlegt). Die Mutation T76S war jedoch nur in 14 der 17 Klone dieser Gruppe vorhanden.

Die beiden bekannten Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T wurden ebenfalls in den sequenzierten Klonen gefunden. Die Mutation rtA181V war in allen 22 Klonen vertreten. Die rtN236T wurde dagegen deutlich seltener gefunden. Sie war in zwei der fünf grünen Klone und lediglich in zwei der insgesamt 17 blauen Klone vorhanden (Tabelle 3.8, rot hinterlegt).

Das exakte Mutationsmuster des ursprünglichen Isolats FvB 150-1 wurde allerdings nicht erneut gefunden. Jedoch gliederte sich der Klon 150-1 in der phylogenetischen Stammbaumanalyse in der blauen Gruppe ein (Abbildung 3.25). Die Zugehörigkeit fand sich auch im Mutationsmuster wieder (Tabelle 3.8).

In der ersten Abnahme zu Beginn der Tenofovirtherapie sind die beiden Gruppen in etwa zu gleichen Teilen vertreten. In der zweiten Abnahme nach 33 Monaten Therapie mit Tenofovir wurden jedoch ausschließlich Klone der blauen Gruppe gefunden. Die Mutation T76S ist in der ersten Abnahme in vier von sechs Klonen vorhanden, in der zweiten Abnahme in zehn von elf Klonen. Im Gegensatz dazu konnte sich die Mutation rtN236T unter Tenofovirtherapie nicht durchsetzen. Ist sie in der ersten Abnahme noch in zwei der sechs blauen Klone vorhanden, wurde sie in der zweiten Abnahme gar nicht mehr gefunden.

3.6.1.3 Polymorphismusanalyse anhand eines Konsensus aller HBV Genotypen

Die festgestellten Mutationen wurden im nächsten Schritt anhand eines Vergleiches mit einem Konsensus aus deutlich mehr Sequenzen überprüft. Für diesen Vergleich wurden über 4.000 Aminosäuresequenzen der HBV-Polymerase aus der Onlinedatenbank HBVdb (*The Hepatitis B Virus database*, Hayer et al. 2013) herangezogen. Im Gegensatz zum vorangegangenen Vergleich umfassten diese Sequenzen alle neun HBV-Genotypen. Dies hatte den Vorteil das Positionen, die nur innerhalb des Genotyps D konserviert sind, identifiziert werden konnten. Mutationen an diesen Stellen der Polymerase könnten sich so als Polymorphismen herausstellen.

Auch hier wurden Austausche mit einer Häufigkeit von mehr als 5 % als Polymorphismus definiert. Auf diesem Weg wurden in der Primerdomäne die Austausche N45D und H73N als Polymorphismus eingestuft (Tabellen 3.8 und 3.9, schraffiert). In der Spacerdomäne stellten sich die Mutationen A273T und F310S als Polymorphismus heraus. Und in der Reversen Transkriptase wurden die Austausche rtN118T und rtF221Y aus den Mutationsprofilen gestrichen.

Tabelle 3.9 Charakterisierung der viralen Quasizepezies der Abnahme nach 33 Monaten Tenofovirtherapie des Patienten FvB 150. Die für das einzige gefundene Mutationsmuster charakteristischen Mutationen sind blau hinterlegt dargestellt. Mutationen die in allen Klonen gefunden wurden sind grau und die für die Resistenz wahrscheinlich entscheidenden Mutationen sind rot hinterlegt dargestellt. Mutationen, die anhand des Vergleichs mit einem allgemeinen HBV-Konsensus als Polymorphismen definiert wurden, sind schraffiert hinterlegt.

Domäne	Abnahme nach 33 Monaten Tenofovirtherapie										
	Klon 2-01	Klon 2-07	Klon 2-08	Klon 2-09	Klon 2-10	Klon 2-11	Klon 2-12	Klon 2-13	Klon 2-14	Klon 2-15	Klon 2-16
Primer											
	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N
	T76S		T76S								
	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E
Spacer				T239I				G245E			
	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T
	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T
								H294L			
	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K
	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K
Reverse Transkriptase							rtS109P				
	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G
	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N
	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V
	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A
	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y
	rtF249S										
	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R
rtI315L				rtI315L							
										rtY327F	
RNaseH								H701P			
											V827A
									A828T		

3.6.2 Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Klone

Neben der genotypischen Charakterisierung wurden ausgewählte repräsentative Klone auch phänotypisch auf ihre Adefovir- und Tenofovirresistenz getestet. Ein Ziel dieser phänotypischen Charakterisierung war es, die für die hohen Resistenzen ursächliche(n) Mutation(en) zu finden. Dafür wurden aus den Ganzgenomklonen zunächst 1.1-fache Überlängenkonstrukte hergestellt (2.2.11.2). Diese konnten anschließend in den phänotypischen Assay zur Resistenzbestimmung eingesetzt werden (2.2.16). Tabelle 3.10 zeigt einen Überblick über die ausgewählten Klone mit ihren Mutationen, die ermittelten Resistenzfaktoren und die Fitnesswerte.

Für das ursprüngliche Isolat FvB 150-1 wurden mit einem RF_{50} von 41,5 für Adefovir und einem RF_{50} von 28,2 für Tenofovir erneut extrem hohe Resistenzfaktoren ermittelt (Tabelle 3.10, Klon 150-1). Alle neu klonierten Klone zeigten jedoch eine etwa vier- bis zwölfmal geringere Adefovirresistenz und eine drei- bis achtfach geringere Tenofovirresistenz (Abbildung 3.26).

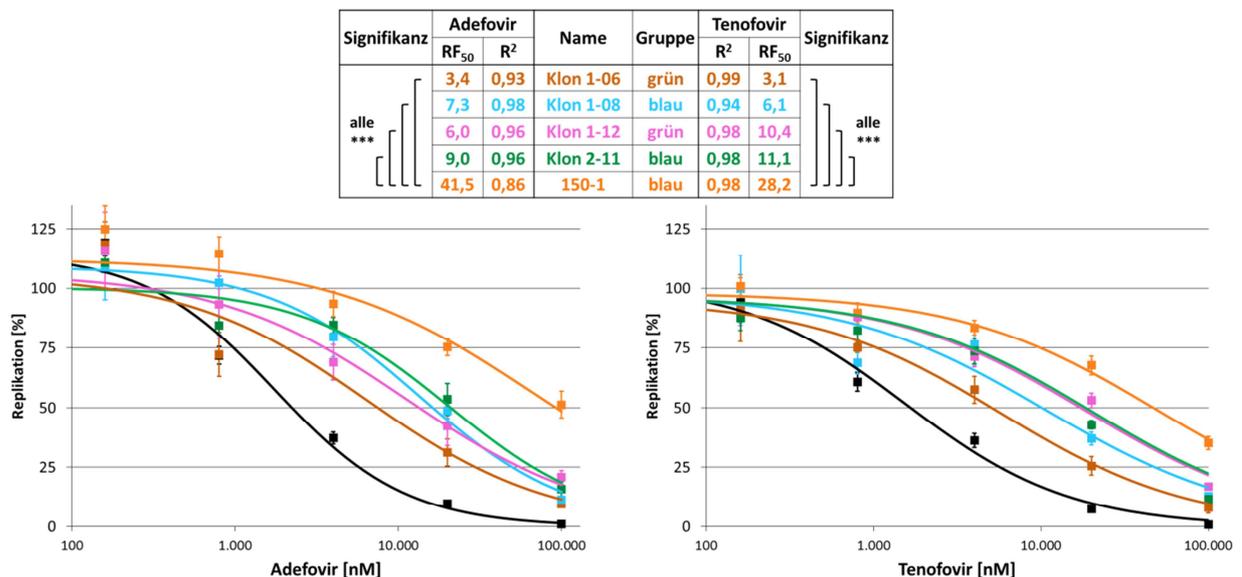


Abbildung 3.26: Vergleich des ursprünglichen Isolats FvB 150-1 mit den neu klonierten Klone. Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Adefovir- und der Tenofovirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), der neu klonierten Klone 1-16 (braun), 1-08 (hellblau) und 2-11 (grün), 1-12 (rosa) und 1-16 (braun) und des Klons 150-1 (orange). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler sowie die Regressionskurven. Die Gruppenzugehörigkeit der Klone, die Bestimmtheitsmaße (R^2) der Regressionen und die Resistenzfaktoren (RF_{50}) zum Wildtyp sowie die Signifikanz der relevanten Unterschiede sind in der Box über den Graphen angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen * $\triangleq p < 1,4 \times 10^{-3}$, ** $\triangleq p < 2,9 \times 10^{-4}$, *** $\triangleq p < 2,9 \times 10^{-5}$, ns \triangleq nicht signifikant.

Mit Ausnahme des nicht replizierenden Klons 1-05, war der Klon 1-08 genotypisch dem Klon 150-1 am ähnlichsten (Tabelle 3.8). Ihm fehlte jedoch unter anderem die Adefovir- und Tenofovir-Resistenzmutation $rtN236T$. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob diese Mutation eine Bedeutung für die außergewöhnlich hohen Resistenzen des Klons 150-1 haben könnte. Dafür wurde sie über eine ortsspezifische Mutagenese (2.2.10) in den Klon 1-08 eingefügt. Der daraus resultierende Klon 1-08-A zeigte im phänotypischen Assay signifikant höhere Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir (RF_{50} ADV = 26,6 und RF_{50} TDF = 29,7; Abbildung 3.27 oben). Mithilfe zwei weiterer ortsspezifischer Mutagenesen des Klons 1-08-A wurden auch die Positionen $rtN118$ und $rtT128$ der Reversen Transkriptase an den Genotyp des Klons 150-1 angeglichen. Der daraus resultierende Klon 1-08-C zeigte jedoch keine signifikante Änderung der Resistenzfaktoren gegenüber dem

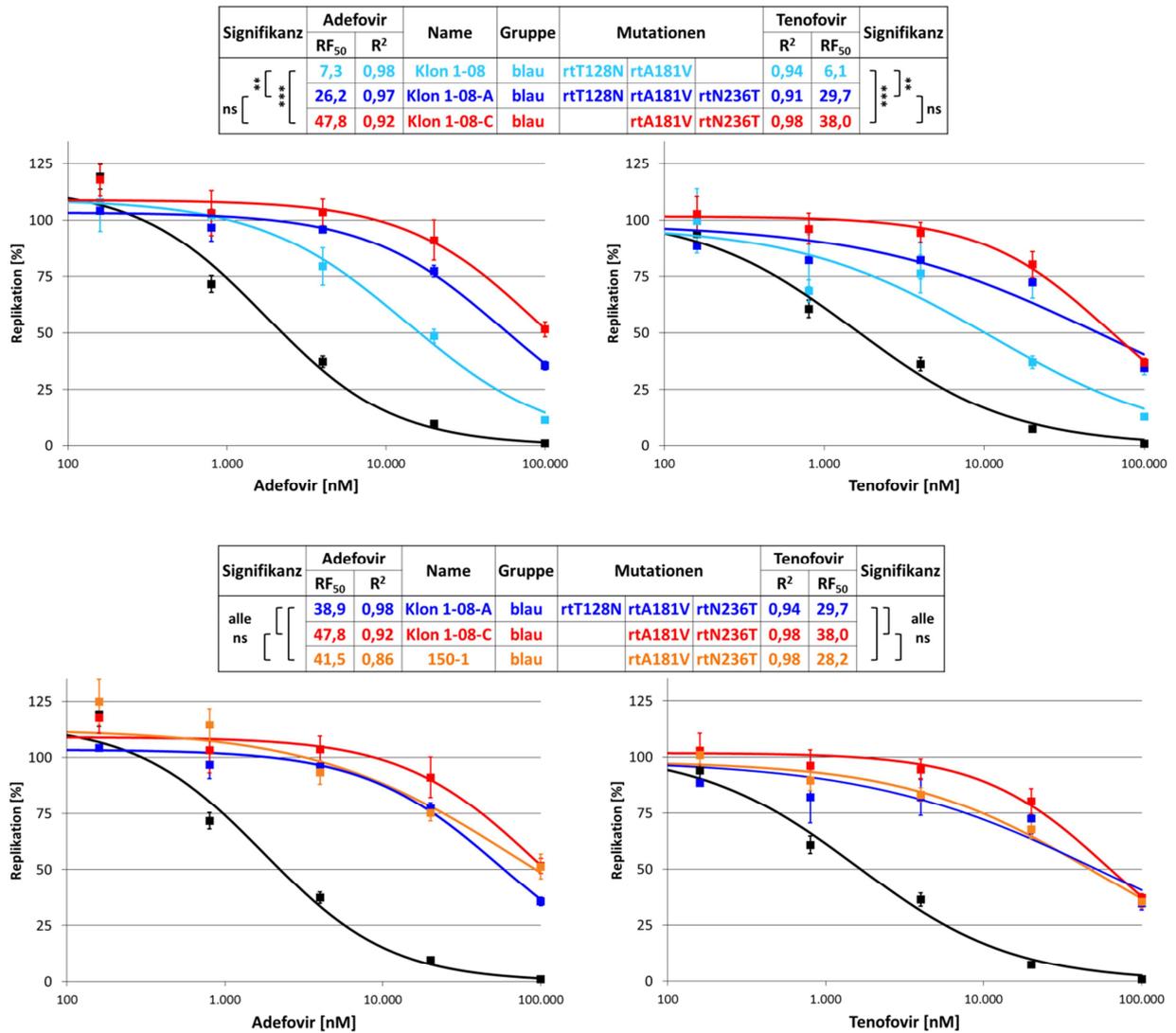


Abbildung 3.27: Rekonstruktion der hohen Adefovir- und Tenofovirresistenzen (oben) und Vergleich mit dem ursprünglich gefundenen Isolat FvB 150-1 (unten). Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Adefovir- und der Tenofovirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), des Klons 1-08 (hellblau), des Klons 1-08-A (dunkelblau), des Klons 1-08-C (rot) und des ursprünglichen Isolats 150-1 (orange). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler sowie die Regressionskurven. Die Gruppenzugehörigkeit der Klone, die für den Vergleich relevanten Mutationen, die Bestimmtheitsmaße (R²) der Regressionen und die Resistenzfaktoren (RF₅₀) zum Wildtyp sowie die Signifikanz der relevanten Unterschiede sind in der Box über den Graphen angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen * $\triangleq p < 1,4 \times 10^{-3}$, ** $\triangleq p < 2,9 \times 10^{-4}$, *** $\triangleq p < 2,9 \times 10^{-5}$, ns \triangleq nicht signifikant.

Die Mutation K90E war sowohl in der blauen, als auch in der grünen Gruppe vorhanden. Der Klon 1-12 (grüne Gruppe), der neben der K90E auch die beiden bekannten Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T hatte, zeigte deutlich geringere Resistenzen im Vergleich zu den Klonen 150-1, 1-08-A und 1-08-C (Abbildung 3.28 oben).

Der Einfluss der genotypisch als relevant eingestuften T76S wurde überprüft, in dem sie mittels ortsspezifischer Mutagenese aus dem Klon 1-08-C entfernt wurde (2.2.10). Der aus der Mutagenese resultierende Klon 1-08-D zeigte eine im Vergleich zum Klon 1-08-C achtfach geringere Adefovirresistenz und eine vierfach geringere Tenofovirresistenz (Abbildung 3.28 unten). Die Resistenzfaktoren des Klons 1-08-D entsprachen damit in etwa denen der übrigen unveränderten Ganzgenomklone (Tabelle 3.10).

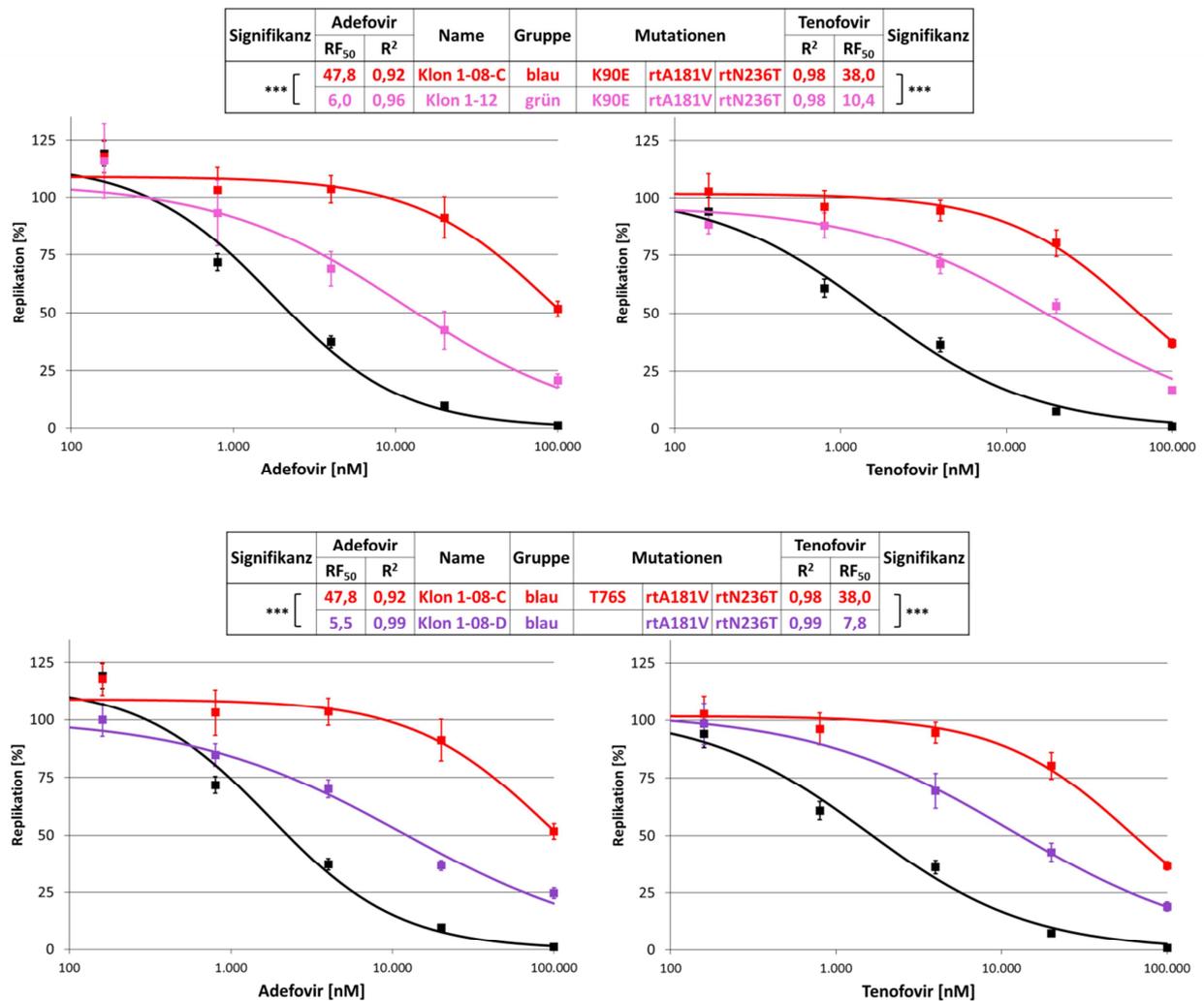


Abbildung 3.28: Einfluss der Mutationen K90E (oben) und T76S (unten). Dargestellt ist die Replikation in % in Abhängigkeit von der Adefovir- und der Tenofovirkonzentration in nM des Wildtyps (schwarz), des Klons 1-08-C (rot) mit T76S und des Klons 1-08-D (lila) ohne T76S. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler sowie die Regressionskurven. Die Bestimmtheitsmaße (R^2) der Regressionen und die Resistenzfaktoren (RF_{50}) zum Wildtyp sowie die Signifikanz der relevanten Unterschiede sind in der Box rechts oben angegeben. Die Bonferroni-adjustierten Signifikanzgrenzen betragen $* \triangleq p < 1,4 \times 10^{-3}$, $** \triangleq p < 2,9 \times 10^{-4}$, $*** \triangleq p < 2,9 \times 10^{-5}$, ns \triangleq nicht signifikant.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Mutation rtA181V ohne die Mutationen T76S oder rtN236T zu tendenziell geringeren Resistenzen führte, als in der Kombinationen mit einer diese beiden Mutationen (Abbildung 3.29). Zwischen dem Klon 1-06 (nur rtA181V) und den Klonen 1-08 und 2-11 (beide T76S + rtA181V) war dieser Unterschied für die Adefovirresistenz sogar signifikant. Für Tenofovir war dagegen der Unterschied zwischen dem Klon 1-06 und den Klonen 1-12 (rtA181V + rtN236T) und 2-11 (T76S + rtA181V) signifikant.

4 Diskussion

4.1 Erschließung von niedrigtitrigen Patientenseren für die phänotypische Charakterisierung von HBV-Mutanten

In der Vergangenheit wurden für die Charakterisierung von HBV-Mutanten auf ihre Resistenz oft lediglich bestimmte Bereiche der Reversen Transkriptase angeschaut. Für eine exakte phänotypische Charakterisierung ist die PCR-basierte Amplifikation des kompletten Genoms jedoch äußerst ratsam. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Wahl einer geeigneten Polymerase. Diese muss möglichst sensitiv sein, um auch geringe Ausgangsmengen an HBV-Genomen amplifizieren zu können, denn Patienten haben während der Therapie oft nur einen niedrigen Virustiter. Außerdem steht oft nur ein geringes Volumen des Serums für die Charakterisierung zur Verfügung. Neben einer hohen Sensitivität muss die PCR aber auch die fehlerfreie Amplifikation des Genoms gewährleisten. Dieser Punkt ist besonders wichtig, wenn die Amplifikate anschließend auf das Vorhandensein von Resistenzmutationen analysiert werden sollen, denn schon durch ein einziges verändertes Basenpaar kann aus einem Wildtyp eine resistente Mutante werden.

Bis dato wurde in dieser Arbeitsgruppe für die Amplifikation von HBV-Genomen aus Seren sowie für sämtliche PCRs im Rahmen von Klonierungen die *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase genutzt. Sie zeichnet sich durch eine sehr geringe Fehlerrate von lediglich $4,4 \times 10^{-7}$ Fehlern pro Basenpaar aus. Das bedeutet, dass statistisch bei einer PCR mit 35 Zyklen lediglich 0,05 Basenpaare des 3,2 kb großen HBV-Genoms nicht korrekt sind. In der Praxis ist diese geringe Fehlerwahrscheinlichkeit kaum noch relevant, sollte aber bei der Sequenzbewertung nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. Die *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase hat allerdings die nachteilige Eigenschaft einer relativ geringen Sensitivität im Vergleich zu anderen Polymerasen. Für eine erfolgreiche Amplifikation mussten mindestens 1×10^6 Genomäquivalente in die PCR eingesetzt werden (Abbildung 3.1). Mit dem sehr effizienten *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* konnte die DNA aus bis zu 200 μ l Serum aufgereinigt und von den 50 μ l Eluat konnten anschließend nicht mehr als 5 μ l in die PCR eingesetzt werden. Daraus ergab sich, dass Seren mit einem Virustiter von weniger als 5×10^7 GE/ml nicht mehr zuverlässig als Ganzgenom amplifiziert werden konnten. Diese Seren konnten höchstens als subgenomische Teilstücke amplifiziert und anschließend wieder zu einem Ganzgenom zusammengesetzt werden. Allerdings kann hierbei kaum vermieden werden, dass auch Teilstücke verschiedener Virusvarianten der Quasispezies zu einem Genom zusammengefügt werden. Die so entstehenden Genome können im Patienten nicht vorkommende Klonierungsartefakte darstellen und geben daher nicht unbedingt die ursprüngliche Quasispezies wieder.

Es wurde daher nach einer sensitiveren Polymerase gesucht, die trotzdem noch eine ausreichende Fehlerkorrektur besitzt. Mit der *PfuTurbo* DNA Polymerase war es möglich Ganzgenome aus Seren mit einem Titer von nur 5×10^3 GE/ml zu amplifizieren (Abbildung 3.1). Die *PfuTurbo* DNA Polymerase war damit um vier Zehnerpotenzen sensitiver als die *Phusion High Fidelity* DNA Polymerase, weist jedoch laut Herstellerangaben eine etwa sechsfach höhere Fehlerrate ($2,8 \times 10^{-6}$ Fehler pro bp) auf. Statistisch ergeben sich damit 0,3 falsche Basenpaare pro Amplifikat. In der Praxis konnte jedoch in zehn sequenzierten Klonen kein einziger Fehler gefunden werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch die sechsfach höhere Fehlerrate noch absolut ausreichend für die Amplifikation von HBV-Ganzgenomen ist.

Franziska Rinker (2013) konnte in ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. D. Glebe zeigen, dass sich eine normale *Taq* DNA Polymerase nicht für die Ganzgenomamplifikation eignet. Bei einer theoretischen Anzahl von 2,6 fehlerhaften Basenpaaren pro Amplifikat, hat sie insgesamt sogar sechs Fehler beim entsprechenden Versuchsansatz empirisch festgestellt. Hierbei wurde allerdings nur ein Klon sequenziert

Die Sensitivität der Ganzgenomamplifikation konnte mit der *PfuTurbo* DNA Polymerase in dieser Arbeit um den Faktor 10.000 entscheidend verbessert werden. Die Etablierung dieser neuen PCR-Methodik war essentiell um die zweite Abnahme des Patienten FvB 150 mit einem Virustiter von etwa 1×10^5 GE/ml überhaupt als Ganzgenom amplifizieren zu können (Abbildung 3.24).

4.2 HBV-Konstrukte unter der vollständigen Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren

Im ersten Schritt der Erstellung von replikationsfähigen HBV-Überlängenkonstrukten wird das Ganzgenom in ein Expressionsplasmid kloniert. Dies dient vor allem der einfachen Sicherung der vorhandenen Variantenvielfalt der Quasispezies. Die klonierten Virusvarianten des amplifizierten Serums können außerdem sequenziert und genotypisch charakterisiert werden. Soll eine Auswahl der charakterisierten Klone jedoch zusätzlich phänotypisch getestet werden, müssen die entsprechenden Genome zuerst in eine replikationsfähige Form gebracht werden. Dieser Schritt ist nötig, denn die lineare Form eines Ganzgenoms kann nicht in die prägenomische RNA (pgRNA) transkribiert werden, da diese etwa 200 bp länger als das komplette Genom ist (Abbildung 1.2). Für eine Replikation des Virus wird daher entweder eine zirkuläre Form des Genoms (Günther et al. 1995) oder ein Überlängenkonstrukt benötigt (Durantel et al. 2005). In der Literatur wurden bereits verschiedene Überlängenkonstrukte beschrieben.

Das kürzeste lineare replikationsfähige in ein Plasmid klonierte HBV-Konstrukt ist als 1.1-faches Überlängenkonstrukt beschrieben worden (Durantel et al. 2005). Im Vergleich zum einfachen Ganzgenom besitzt es am Ende eine etwa 200 bp lange Wiederholung des Genomanfangs und am Anfang eine 12 bp lange redundante Sequenz, so dass die komplette Länge der viralen pgRNA enthalten ist (Abbildung 2.7). In diesem Konstrukt wird jedoch lediglich die Expression der Oberflächenproteine und des X-Proteins vom jeweils natürlichen HBV-Promotor reguliert. Für die Expression der restlichen Proteine, sowie auch für die Transkription der pgRNA muss dieser Vektor einen externen Promotor bereitstellen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide kodierten daher für den frühen Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promotor) direkt vor dem Überlängenkonstrukt. Hierbei handelt es sich um einen sehr starken Promotor, was eine dementsprechend starke Transkription und folglich auch eine hohe Replikationsrate des Virus zur Folge hat. Wird das Überlängenkonstrukt jedoch in 5'-Richtung entsprechend erweitert, sodass alle Elemente der natürlichen HBV-Promotoren enthalten sind, können diese den CMV-Promotor ersetzen. Mit einem solchen 1.5-fachen Überlängenkonstrukt ist auch eine Analyse der regulatorischen Funktionen der einzelnen Promotorelemente möglich.

Durch die 5'-Erweiterung der HBV-Sequenz in diesen 1.5-fachen Überlängenkonstrukt ergibt sich jedoch ein Problem beim qPCR-basierten Nachweis der Replikation in transient transfizierten Zellen. Anders als beim Southern Blot werden die Amplifikate in der qPCR für die Quantifizierung nicht nach ihrer Größe aufgetrennt. Daher kann die qPCR nicht zwischen den neu gebildeten HBV-Genomen und dem Hintergrund aus transfizierten Plasmiden unterscheiden. Trotz dreimaligem Waschen der Zellen nach der Transfektion übersteigt der Plasmidhintergrund die Menge an neu gebildeten HBV-Genomen um das

Hundertfache (Geipel 2011). Um dennoch die Replikation von transfizierten 1.1-fachen Überlängenkonstrukten detektieren zu können, wurde mit der diskriminierenden HOPE-PCR eine Methode entwickelt, die spezifisch neu produzierte HBV-DNA nachweisen kann (Geipel 2011). Die virale DNA wird durch diese PCR 1.000-fach besser erkannt als Plasmide mit 1.1-fachen Überlängenkonstrukten. Um diesen Effekt zu erreichen wurden die Primerbindestellen so gewählt, dass vom zirkulären HBV-Genom ein etwa 300 bp großes Fragment amplifiziert wird (Abbildung 2.4). Die gleichen Primer binden auf dem Expressionsplasmid, welches für ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt kodiert, jedoch in einem Abstand von etwa 3,4 kb. Die Elongationszeit der PCR ist aber an das zehnfach kleinere Amplifikat angepasst. Die PCR diskriminiert daher die Plasmide gegenüber den HBV-Genomen, da die Amplifikation des größeren Fragments deutlich ineffizienter ist.

Diese Methode ließ sich für den Nachweis von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten allerdings nicht verwenden. Im Gegensatz zu den 1.1-fachen Überlängenkonstrukten ist die Bindestelle des reversen Primers in den längeren 1.5-fachen Konstrukten doppelt vorhanden (Abbildung 2.5). Die zweite Bindestelle befindet sich in einem Abstand von etwa 300 bp vom Forwardprimer, wodurch von den Plasmiden ebenfalls ein kleines Fragment effizient amplifiziert werden kann. Dieses Problem könnte theoretisch umgangen werden, in dem die Primerbindestelle des Forwardprimer um 1 kb in 5'-Richtung versetzt würde. Der Primer würde damit wieder nur einmal auf dem Überlängenkonstrukt binden. Allerdings müsste der versetzte Forwardprimer in einem Bereich der rcDNA binden, der auf dem Amplifikat des Plusstranges nicht enthalten ist, da dessen Amplifikation mit dem mRNA-Stück am Anfang des Stranges endet (Abbildung 2.5). Aufgrund der nicht kovalent geschlossenen Form des HBV-Genoms ist daher eine Verlängerung des PCR-Fragments in diese Richtung nicht möglich. Für den Replikationsnachweis von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten war eine einfache Adaption der HOPE-PCR deshalb nicht realisierbar und es musste nach einer anderen Möglichkeit gesucht werden, um den Plasmidhintergrund zu verringern.

Mit einem spezifischen Verdau durch das Restriktionsenzym DpnI wurde bereits erfolgreich zwischen Plasmid- und HBV-DNA unterschieden (Köck et al. 2012), allerdings nicht in einer hoch sensitiven qPCR sondern im weniger sensitiven Southern Blot. Aufgrund seiner relativ kurzen Erkennungssequenz (GATC) schneidet DpnI die meisten Nukleinsäuren in viele kleine Stücke. Als Restriktionsenzym des Typs IIM erkennt es außerdem ausschließlich dam-methylierte DNA. Diese Eigenschaft wird in der ortsspezifischen Mutagenese für die Unterscheidung zwischen dem Plasmid-Template aus *E. coli* (methyliert) und dem mutagenisierten PCR-Amplifikat (nicht methyliert) genutzt (Papworth et al. 1996). Genau wie das PCR-Amplifikat ist auch die HBV-DNA nicht methyliert und sollte daher nicht von DpnI erkannt werden. Dies konnte durch den Nachweis von DpnI-verdauter HBV-DNA aus einem humanen Serum bestätigt werden, sie wurde im Vergleich zur Plasmid-DNA deutlich ineffektiver verdaut (Abbildung 3.2). Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen inhibiertem und nicht inhibiertem Zellkulturüberstand nach dem DpnI-Verdau nachgewiesen werden. Damit eignete sich der Verdau mit DpnI offensichtlich nicht zur Verringerung des Plasmidhintergrunds. Die DNA-Mengen der nicht inhibierten Proben waren vergleichbar mit den HOPE-PCR-Werten der inhibierten Zellkulturüberstände, daher war davon auszugehen, dass auch die virale DNA verdaut wurde. Eukaryotische Zellen besitzen jedoch keine dam-Methylasen, deshalb kann nur eine unspezifische Aktivität des DpnI verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung für den unspezifischen Verdau wären Faktoren aus dem Zellkulturüberstand, die bei der DNA-Aufreinigung nicht gewaschen wurden.

Ein weiterer methodischer Ansatz basierte auf der Verwendung des Enzyms dsDNase. Hierbei handelt es sich um eine rekombinante DNase aus *Pandalus borealis* die laut dem Hersteller doppelsträngige DNA 1.000-mal effizienter verdaut als einzelsträngige DNA (Nilsen et al. 2010). Da das HBV-Genom nur

partiell doppelsträngig ist (Abbildung 1.2), sollte der einzelsträngige Bereich nur in sehr geringem Ausmaß von der dsDNase verdaut werden, während die Plasmid-DNA komplett fragmentiert werden müsste. Für den Nachweis der Genome mittels qPCR wurden daher Primer verwendet, die in diesem einzelsträngigen Bereich des Genoms binden (Abbildung 2.5). Ein zusätzlicher Vorteil des Enzyms besteht darin, dass es direkt in den PCR-Mastermix gegeben werden kann. Es wird nach dem Verdau durch die Aktivierung der Hotstart-Polymerase bei 95 °C deaktiviert. Der dsDNase-Verdau mit anschließender qPCR wird im Folgenden zusammen als dsDNase-PCR bezeichnet. Mithilfe der dsDNase-PCR wurden etwa 1.000-mal weniger Plasmide nachgewiesen als mit der X-PCR (Abbildung 3.2), die nicht zwischen Plasmiden und HBV-DNA unterscheidet. Ein schwacher unspezifischer Verdau der viralen DNA war allerdings auch zu erkennen. Wird die Verringerung der viralen DNA in die Berechnung der Spezifität mit einbezogen, so wurde die Plasmid-DNA etwa 230-mal effizienter verdaut als die HBV-DNA. Es ist davon auszugehen, dass in dem PCR-Mastermix keine optimalen Bedingungen für den dsDNase-Verdau herrschten, da dieser an die Erfordernisse der enthaltenen Polymerase angepasst ist. Dies erklärt den Unterschied zu dem Ergebnis von Nilsen et al. (2010).

Um die Spezifität des dsDNase-Verdaus zu verbessern, wurde die Enzymmenge titriert (Abbildung 3.3). Durch die Erhöhung der Enzymmenge nahm jedoch gleichzeitig auch die unspezifische Aktivität der dsDNase zu. Die Veränderungen führten daher nicht zu einer Verbesserung des Verhältnisses von Plasmid- zu HBV-DNA (Abbildung 3.3). Ein weiterer Faktor für die Effektivität des Verdaus ist die Abhängigkeit der dsDNase-Aktivität von zweiwertigen Kationen, wobei besonders mit geringen Mengen an Mn^{2+} eine starke Erhöhung der Aktivität erreicht werden kann (Nilsen et al. 2010). Bereits der Zusatz von 1 mM $MnCl_2$ zeigte jedoch einen stark inhibierenden Effekt auf die anschließende qPCR (Tabelle A.1), denn auch DNA Polymerasen sind abhängig von zweiwertigen Kationen. Eine Anpassung der $MgCl_2$ -Konzentration in der PCR-Reaktion war jedoch nicht möglich, da das $MgCl_2$ bereits im fertigen Mastermix enthalten war. Um optimale Bedingungen für den Verdau zu schaffen, hätte dieser unabhängig von der PCR durchgeführt werden und die Proben anschließend erneut aufgereinigt werden müssen. Bei der Aufreinigung wäre ein technisch bedingter Verlust von viraler DNA jedoch nicht zu vermeiden gewesen, was die Sensitivität der Nachweismethode negativ beeinflusst hätte.

Im Amplifikat der dsDNase-PCR befindet sich eine BamHI-Schnittstelle. BamHI gehört zu den Restriktionsenzymen des Typs II, die ebenfalls nur doppelsträngige DNA verdauen. Der BamHI-Verdau der Plasmide sollte den Hintergrund in der dsDNase-PCR noch weiter reduzieren. Allerdings zeigte sich im Vergleich zur dsDNase-PCR keine Verbesserung (Abbildung 3.2).

Dennoch konnte mit der dsDNase-PCR ein deutlicher Unterschied (Faktor 10) zwischen inhibiertem und nicht inhibiertem Zellkulturüberstand gezeigt werden. Es ist also möglich mit Hilfe dieser Nachweismethode trotz Plasmidhintergrunds eine HBV-Replikation nach einer transienten Transfektion in der Zellkultur nachzuweisen. Die HOPE-PCR blieb im Fall von transient transfizierten 1.1-fachen Überlängenkonstrukten allerdings deutlich sensitiver. Sie reduzierte den gemessenen Plasmidhintergrund um mehr als vier Zehnerpotenzen, während die dsDNase-PCR lediglich eine Reduktion um etwa eine Zehnerpotenz erreichte (Abbildung 3.5). Die dsDNase-PCR ist jedoch derzeit die einzige Möglichkeit des PCR-basierten Replikationsnachweises von transient transformierten 1.5-fachen Überlängenkonstrukten.

Mit dieser neuen Nachweismethode konnte gezeigt werden, dass das erstellte 1.5-fache Wildtyp-Überlängenkonstrukt in HuH7-München Zellen repliziert. Es zeigte sich allerdings auch, dass die Replikation im Vergleich zum entsprechenden 1.1-fachen Überlängenkonstrukt etwa vierfach geringer ausfiel. In 1.5-fachen Überlängenkonstrukten wird die Transkription der viralen pgRNA nicht wie in den

1.1-fachen Konstrukten vom starken CMV-Promotor kontrolliert, sondern von den natürlichen HBV-Promotoren und Enhancern. Eine geringere Replikation des Wildtyps war daher zu erwarten.

Aufgrund der geringeren Replikation der 1.5-fachen Überlängenkonstrukte und der geringeren Sensitivität des Replikationsnachweises wurde beschlossen für die Phänotypisierung weiterhin 1.1-fache Überlängenkonstrukte zu verwenden. Viele HBV-Varianten weisen weniger als 10 % der Wildtypreplikation auf, ein Replikationsnachweis ihrer 1.5-fachen Überlängenkonstrukten mit der dsDNase-PCR wäre daher nur schwer möglich. Ein inhibitorischer Effekt der Nukleo(s)tidanaloga bei diesen Viren wäre mit der dsDNase-PCR nicht mehr nachweisbar und folglich die Berechnung einer IC_{50} oder gar einer IC_{90} nicht durchführbar gewesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Resistenz des HBV gegen die Nukleos(t)idanaloga wahrscheinlich ausschließlich von Mutationen in der Polymerase abhängig ist. Daher sollte die Wahl des kürzeren 1.1-fachen Überlängenkonstruktes keine Auswirkung auf die ermittelten Resistenzen haben.

Die Kombination aus den 1.5-fachen Überlängenkonstrukten und der dsDNase-PCR als schnell durchzuführender Replikationsnachweis stellt allerdings ein sehr nützliches Werkzeug für die Charakterisierung der Promotorbereiche des HBV-Genoms dar. Es könnten zum Beispiel Promotoren aus verschiedenen Isolaten in das gut replizierende Wildtypkonstrukt kloniert und so ihr Einfluss auf die Replikation getestet werden. Bis dato war es notwendig für die Charakterisierung der Promotorbereiche stabile Zelllinien herzustellen, da in diesen kein Plasmidhintergrund mehr den Replikationsnachweis stört. Alternativ hätte die Replikation mit Southern Blots quantifiziert werden müssen. Aufgrund des erheblich höheren Aufwands für die Erstellung stabiler Zelllinien und des Southern Blots war es nicht möglich eine große Anzahl an Isolaten zu testen. Mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden lässt sich aber in der Zukunft eine große Zahl an HBV-Varianten mit überschaubarem Arbeitsaufwand charakterisieren.

4.3 Optimierung des phänotypischen Assays zur Bestimmung der viralen Resistenz gegen Nukleos(t)idanaloga

Der bereits von Dr. A. Geipel (2011) etablierte phänotypische Assay zur Resistenzbestimmung bei HBV-Varianten wurde im Rahmen dieser Arbeit deutlich verbessert.

Als erstes wurde die automatisierte DNA-Aufreinigung auf ein deutlich effizienteres Kit umgestellt. Die Aufreinigungseffizienz konnte so um fast das Siebenfache gesteigert werden. Dadurch konnten auch Assays mit geringerer Transfektionseffizienz und Isolate mit schwächerer Replikation noch verlässlich in ihrer Replikation quantifiziert werden. Außerdem konnte mit dem neuen Kit der Probendurchsatz um 25 % gesteigert und eine deutliche Kostenreduktion von 75 % erreicht werden.

Zusätzlich wurde die Zahl der nicht inhibierten Proben pro Assay verdoppelt, da ihre Replikationswerte für die Berechnung der IC_{50} und IC_{90} besonders entscheidend sind. Ein verlässlicher und genauer Mittelwert der absoluten Replikation ist für die Ermittlung der relativen Werte unerlässlich. Durch die Erhöhung der Anzahl dieser Proben wurde somit die Gesamtgenauigkeit des Assays entscheidend verbessert. Die entstehenden höheren Kosten wurden durch die Kostenreduktion bei der Aufreinigung mehr als kompensiert. Die erhöhte Probenzahl konnte durch den verbesserten Durchsatz in der Aufreinigung aufgefangen werden.

4.4 Einordnung der phänotypischen Daten des HOPE-Projekts

4.4.1 Wildtypkonstrukt und HBV-Isolate ohne Resistenzmutationen

Die Optimierung des phänotypischen Assays wurde in mehreren Schritten vorgenommen. Um Nebeneffekte der Optimierung bei der Auswertung ausschließen zu können, wurde nach jeder Veränderung des Assay eine neue Wildtypkonsensuskurve erstellt. Außerdem wäre eine ANOVA mit unterschiedlichen Konzentrationsabstufungen der Nukleos(t)analoge nicht möglich gewesen. Es konnten keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Konsensuskurven festgestellt werden (Abbildung 3.8). Die Ergebnisse des verbesserten Assays sind daher mit denen des zu Beginn verwendeten Assays vergleichbar. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte (Tabelle 3.1) waren insbesondere für Adefovir und Lamivudin leicht höher als in der Dissertation von Dr. A. Geipel (2011) angegeben. Diese geringen Unterschiede resultierten eventuell aus den unterschiedlichen mathematischen Auswertungsmethoden. In der genannten Dissertation wurden die IC_{50} -Werte mit einer einfachen linearen Regression ermittelt. In diese wurden lediglich drei Messpunkte einbezogen. Alle in dieser Arbeit angegebenen Resistenzwerte wurden stattdessen mit einer wesentlich genaueren nicht linearen Regression mit drei Parametern berechnet. In dieses Modell wurden sämtliche Konzentrationsstufen mit einbezogen.

Im Vergleich zu anderen phänotypischen Assays zur Resistenzbestimmung ergaben sich ebenfalls leichte Abweichungen (Langley et al. 2007, Villet et al. 2007). Wie bereits von Dr. A. Geipel (2011) beschrieben, lassen sich diese durch die unterschiedlichen Testsysteme erklären. Einen entscheidenden Einfluss könnten zum Beispiel die verwendeten Zelllinien und die Methode der Quantifizierung der Genomäquivalente haben. Die ermittelten Unterschiede zwischen den vier getesteten Nukleos(t)idanaloga entsprechen den zuvor publizierten Daten (Villet et al. 2007, Geipel 2011).

Neben den Wildtypkonstrukten wurden auch vier Patientenisolate ohne eine bekannte Resistenzmutation getestet. Bei diesen Isolaten konnte keine signifikante Resistenz festgestellt werden (Tabelle 3.2), was die Verlässlichkeit des Assays untermauerte. Auffällig war das Isolat RK 266-1, das signifikant niedrigere Resistenzfaktoren als der Wildtyp zeigte (Abbildung 3.10). Neben resistenten HBV-Mutanten scheint es also auch Varianten zu geben, die besonders sensitiv gegenüber den Nukleos(t)idanaloga sind. Hierbei könnte es sich um einen zufällig ausgewählten Einzelklon handeln aber auch ein Selektionsvorteil dieses Klons zum Beispiel durch eine erhöhte Infektiosität oder andere, im Rahmen dieser Arbeit nicht zu ermittelnde Faktoren, wäre denkbar.

4.4.2 Lamivudinresistenzen

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten genotypischen Daten der HBV-Patientenisolate untermauerten die Beobachtung, dass die Primärmutation $rtM204I$ im Gegensatz zur $rtM204V$ auch relativ häufig ohne eine Sekundärmutation vorkommt (Shaw et al. 2006). Warner et al. (2007) haben publiziert, dass die Sekundärmutationen $rtL80I/V$ häufiger im Zusammenhang mit der Mutation $rtM204I$ als mit der $rtM204V$ zu finden ist. Auch dies konnte mit den hier gezeigten Daten bestätigt werden. Die Mutationen $rtL80I/V$ wurde sogar ausschließlich zusammen mit der $rtM204I$ gefunden. Die Tatsache das keine Kombination aus $rtM204V$ und $rtL80I/V$ gefunden wurde, lag jedoch sehr wahrscheinlich an der geringen Stichprobe von nur vier Isolaten mit $rtM204V$. Wie zu erwarten war, zeigten alle Isolate mit den

Primärmutationen rtM204I/V eine sehr starke Resistenz gegen Lamivudin (Allen et al. 1998) sowie eine Kreuzresistenz gegen Entecavir (Tenney et al. 2004).

Ein Zusammenhang einzelner Mutationen mit der Höhe der Fitness war nicht eindeutig festzustellen. Eventuell verursachten die Mutationen rt80I/V eine tendenziell höhere Fitness. Dies würde die Ergebnisse von Warner et al. (2007) bestätigen. Allerdings müssen die Fitnesswerte des verwendeten phänotypischen Assays sehr vorsichtig bewertet werden. Es wurde lediglich der Polymerase-ORF aus den Patientenseren in das Wildtypkonstrukt kloniert, daher stellen unter anderem das Core-Protein und die pgRNA Chimären aus Patientenisolat und Wildtyp dar. Das Zusammenspiel dieser Chimären mit der nicht chimären Polymerase könnte einen Einfluss auf die Replikation haben (Geipel 2011), da die reverse Transkription direkt abhängig von der Bildung der Nukleokapside ist (Bartenschlager und Schaller 1992).

4.4.3 Kreuzresistenzen zwischen Lamivudin und den Nukleotidanaloga

Es ist bekannt, dass die Mutationen rtA181V/T sowohl zu einer Resistenz gegen Lamivudin als auch gegen die Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir führen (Shaw et al. 2006, Villet et al. 2008). Diese Beobachtungen wurden mit den hier ermittelten phänotypischen Daten für die Mutation rtA181V bestätigt (Abbildung 3.18). Die Isolate mit der Mutation rtA181T wiesen lediglich eine Lamivudinresistenz, jedoch keine Resistenz gegen die Nukleotidanaloga auf (Tabelle 3.5). Die möglichen Ursachen werden später noch ausführlich diskutiert (4.4.5). Wie von Dr. A. Geipel (2011) erstmals beschrieben, wurden jedoch auch Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir in Isolaten mit einer primären Lamivudin-Resistenzmutation an der Position rtM204 gefunden. Diese Isolate enthielten keine Mutation die bisher mit einer Resistenz gegen Nukleotidanaloga in Verbindung gebracht wurde. Diese Resistenzentwicklung ließ sich auch keiner der bekannten Sekundärmutationen zuschreiben. Ursächlich müssen also eine oder mehrere bisher unbekannte Mutationen sein, die wahrscheinlich nur im Zusammenspiel mit einer Primärmutation an der Position rtM204 ihren Effekt verursachen. Entwickelt ein Patient eine Lamivudinresistenz wird der Wechsel zu einer Therapie mit Tenofovir empfohlen (Zoulim und Locarnini 2013). Wahrscheinlich spielen die eher niedrigen Resistenzen *in vivo* bei Tenofovir keine Rolle. Tenofovir kann im Vergleich zu Adefovir in einer deutlich höheren Dosis verabreicht werden, da es weniger nephrotoxisch ist. Global steht Tenofovir allerdings nicht überall für die HBV-Therapie zur Verfügung. Die entdeckte Kreuzresistenz sollte auf jeden Fall bei Lamivudin-vorbehandelten Patienten beachtet werden, die nicht oder schlechter auf die Gabe von Tenofovir und insbesondere Adefovir ansprechen.

4.4.4 Entecavirresistenzen

Alle HBV-Isolate mit einer Mutation an der Position rtM204 wiesen neben einer Lamivudinresistenz auch eine Resistenz gegen Entecavir auf. Auffällig war die hohe Varianz dieser Entecavirresistenzen, die mit den bekannten Resistenzmutationen nicht zu erklären war. Wahrscheinlich haben daher eine oder mehrere noch nicht bekannte Mutationen in der Reversen Transkriptase einen zusätzlichen Einfluss auf die Entecavirresistenz, wie bereits von Dr. Andreas Geipel (2011) vermutet.

Außerdem wurde bei fast allen Isolaten mit einer Entecavirresistenz ein deutlicher Unterschied zwischen dem RF₅₀ und RF₉₀ festgestellt (Tabelle 3.3). Diese Diskrepanz war auch in den im Vergleich zum Wildtyp deutlich flacher abfallenden Inhibitionskurven dieser Isolate zu sehen (Abbildungen 3.11 und 3.12). Dieses verminderte Ansprechen bei hohen Konzentrationen konnte in bisherigen phänotypischen Studien nicht entdeckt werden, da nur die IC₅₀ betrachtet wurde (Villet et al. 2007). Der gleiche

Sachverhalt wurde auch von Dr. A. Geipel (2012) beobachtet und konnte von Pia Seiz in einer anderen Hepatomzelllinie (HepG2) reproduziert werden (Daten noch unveröffentlicht). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in der HIV-Therapie beobachtet (Sampah et al. 2011). Die hohen RF₉₀-Werte lassen vermuten, dass auch bei einer Therapie mit hoher Entecavirdosis die verbleibende Replikation ausreicht, um die Selektion von zusätzlichen Resistenzmutationen über die Zeit zu begünstigen.

Aufgrund ihrer Kreuzresistenz führen die Mutationen rtM204I/V und rtL180M schon zu einer mittleren Entecavirresistenz. Diese wird jedoch unter anderem von der Mutation rtS202G noch verstärkt und führt damit zu einer klinisch relevanten Resistenz (Zoulim und Locarnini 2013). Diese Beobachtungen konnte *in vitro* mit einem mehr als 20-fach höheren RF₅₀ des Isolats RK 194-5 bestätigt werden (Abbildung 3.14).

Die Mutation rtI169T verursacht zusammen mit den Mutationen rtM204I/V und rtL180M ebenfalls eine starke Entecavirresistenz. Das Isolat MS 18-3 mit den Mutationen rtI169L, rtV173L, rtL180M und rtM204V zeigte dagegen keine höhere Resistenz im Vergleich zu den anderen Isolaten mit der Primärmutationen rtM204I/V. Allerdings handelte es sich an der Position rt169 auch lediglich um einen Austausch des Isoleucins durch das sehr ähnliche Leucin. Beide Aminosäuren haben eine fast identische unpolare Seitenkette. Die Aminosäure Threonin, die eine höhere Entecavirresistenz verursacht, hat dagegen eine polare Seitenkette. Daher entsprach die ermittelte Resistenz des Isolats MS 18-3 den Erwartungen.

4.4.5 Resistenzen gegen Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir

Eine Resistenz gegen die Nukleotidanaloga Adefovir (Angus et al. 2003, Fung et al. 2005) und Tenofovir (Lok et al. 2007, van Bömmel et al. 2010, Patterson et al. 2011) wird laut der Literatur von den Mutationen rtA181V/T oder rtN236T verursacht. Es wurde bei zwei getesteten Isolaten mit der Mutation rtA181T im Rahmen dieser Arbeit dennoch keine signifikanten Resistenzen festgestellt (Tabelle 3.5). Auch der mittels ortsspezifischer Mutagenese erstellte Klon MUC 05 mit der Mutation rtA181V wies keine Resistenzen gegen die Nukleotidanaloga auf (Tabelle 3.7). Dies wurde unabhängig voneinander in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. U. Protzer (TU München) sowie im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Für das Isolat FvB 170-3 (Abbildung 3.18) sowie fünf weitere im Rahmen des HOPE-Projekts phänotypisierte Isolate (Geipel 2011) mit der Mutation rtA181V wurden dagegen mittlere Adefovir- und Tenofovirresistenzen ermittelt. Ob eine Mutation an der Position rtA181 allein ausreichend für eine Resistenz gegen die Nukleotidanaloga ist oder ob weitere Mutationen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Bedeutung haben, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht mit Sicherheit sagen. Für eine verlässliche Beurteilung sollten auf jeden Fall weitere Isolate mit diesen Mutationen phänotypisiert werden. Insbesondere müssen weitere Isolate mit der Mutation rtA181T getestet werden, da im HOPE-Projekt lediglich zwei Isolate mit dieser Mutation analysiert wurden.

Das Isolat RK 22-20 enthielt neben der Mutation rtA181T außerdem die Mutation rtA194V, die im Verdacht steht eine Tenofovirresistenz zu verursachen (Amini-Bavil-Olyae et al. 2009). Dies konnte nicht bestätigt werden (Abbildung 3.16). Es ist daher ebenfalls anzuzweifeln, dass die Mutation rtA194V tatsächlich Einfluss auf die Resistenzbildung hat. Aber auch hier wäre es ratsam, das Ergebnis mit weiteren Isolaten abzusichern.

Das Isolat FvB 170-3 mit der Mutation rtA181V wies neben einer mittleren Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir sowie einer leichten Kreuzresistenz gegen Lamivudin (Abbildung 3.18) ebenfalls eine Entecavirresistenz auf. Laut Literatur verursacht die Mutation rtA181V jedoch keine Kreuzresistenz gegen Entecavir (Zoulim und Locarnini 2013). Das zuvor im Rahmen des HOPE-Projekts

charakterisiertes Isolat FvB 150-1 mit den Mutationen rtA181V und rtN236T zeigte ebenfalls eine Resistenz gegen Entecavir (Geipel 2011). In einem Sequenzvergleich zeigten die beiden Isolate eine große Ähnlichkeit. Etwa 75 – 80 % der Mutationen in der Reversen Transkriptase waren identisch, die Mutationen rtR110G und rtK270R wurden ausschließlich in diesen Isolaten gefunden und könnten für die Entecavirresistenz verantwortlich sein. Dieses Isolat wies außerdem sehr hohe Adefovir- und Tenofovirresistenzen auf und wird daher am Ende dieser Arbeit noch näher charakterisiert (4.6). Eine genauere Analyse des Isolats FvB 170-3 wäre jedoch auch sehr interessant.

Die außergewöhnliche, klinisch äußerst seltene Mutationskombination aus rtN236T und rtM250L zeigte ebenfalls einen unerwarteten Phänotyp (Abbildung 3.17). Das Isolat zeigte überraschenderweise keine Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir. Die leichte Entecavirresistenz lässt sich recht gut durch die Mutation rtM250L erklären. Wird das Methionin an dieser Stelle zu einem Valin statt wie hier zu einem Leucin mutiert, führt dies auch ohne weitere Mutationen zu einer Resistenz gegen Entecavir (Tenney et al. 2004). Valin und Leucin haben sehr ähnliche unpolare Seitenketten, womit ein ähnlicher Einfluss auf die Resistenzbildung erklärt werden könnte. Die zusätzlich beobachtete Lamivudinresistenz ließe sich dabei eventuell mit einer Kreuzresistenz erklären. Auf jeden Fall ist eine weitergehende Analyse dieses Isolats sehr ratsam um den Mechanismus der Resistenzbildung näher zu verstehen.

4.4.6 Insertion in der Reversen Transkriptase

Das Isolat BW 111-3 wies einen sehr ungewöhnlichen Genotyp auf. Neben den beiden Mutationen rtI169L und rtA181S hatte es eine Insertion von fünf Aminosäuren zwischen den Positionen 118 und 119 der Reversen Transkriptase. Außer einer sehr schwachen Resistenz gegen Lamivudin zeigte es keine weiteren Resistenzen. Die Lamivudinresistenz lässt sich mit der Mutation rtA181S erklären. Das Serin an dieser Stelle ist dem Threonin sehr ähnlich und die Mutation rtA181T führt zu einer Lamivudinresistenz (Shaw et al. 2006, Villet et al. 2008). Dass die Mutation rtA181S keine Resistenz gegen die Nukleotidanaloga verursachte, stimmte mit den Ergebnissen für die Isolate mit der Mutation rtA181T überein (Tabelle 3.5). Die nicht vorhandene Entecavirresistenz war zu erwarten, da eine Mutation an der Position rtI169 nur im Zusammenhang mit den Mutationen rtM204V und rtL180M zu einer Resistenz gegen Entecavir führt (Zoulim und Locarnini 2013).

Die Insertion hatte wahrscheinlich keinen starken Einfluss auf die Replikation, da sie sich außerhalb der katalytischen Subdomänen der Reversen Transkriptase befindet. Sie ist zwischen der Domäne A und B lokalisiert und führt erstaunlicherweise nicht zu einem kompletten Funktionsverlust der Reversen Transkriptase (Ghany und Liang 2007).

Der Leserahmen der S-Domäne der Oberflächenproteine überlappt vollständig mit der Reversen Transkriptase (Abbildung 1.2), daher besitzt dieses Isolat auch dort eine Insertion. Es kommt jedoch nicht zu einem Stoppcodon (Tabelle A.2), sodass die Funktion der Oberflächenproteine wahrscheinlich erhalten bleibt.

4.4.7 Auswertung der Ringstudie zur Verifizierung des Assays

Für die Ringstudie mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. U. Protzer (TU München) wurden ausschließlich Ergebnisse verifiziert, die nicht der gängigen Theorie entsprachen. Trotzdem konnten die meisten in München gemessenen Resistenzfaktoren bestätigt werden (Tabelle 3.7), was die Zuverlässigkeit des verwendeten Testsystems verdeutlicht.

Insbesondere einige unerwartet hohe RF_{50} für Tenofovir bei Klonen mit Lamivudinresistenzmutationen konnten nicht bestätigt werden (Abbildung 3.20). Für diese Klone wurde entweder keine Resistenz oder eine deutlich geringere Resistenz ermittelt. Im Ganzen wurde eine große Bandbreite der Nukleotidanaloga-resistenzen bei Klonen mit Lamivudinresistenzmutationen festgestellt. Hierbei handelte es sich nicht um Patientenisolat sondern um Wildtypkonstrukte mit der zu testenden Mutation. Für das Auftreten und die hohe Varianz der Kreuzresistenzen müssen also Polymorphismen mit verantwortlich sein, die auch im Wildtypkonstrukt vorhanden sind. Treten sie im Zusammenhang mit den Mutationen $rtM204I/V$ auf, führen sie zu einer Resistenz, alleine haben sie dagegen keinen Einfluss. Wie bereits beschrieben (4.4.3) wurden diese Kreuzresistenzen auch in Patientenisolaten gefunden, allerdings waren die dort detektierten Resistenzfaktoren im Schnitt niedriger. Auf die möglichen Auswirkungen in der Therapie wurde bereits eingegangen.

4.5 Bewertung der Mutationen $rtS78T$, $rtL229F/V$ und $rtM309K$

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Mutationen ermittelt, die signifikant häufiger in Patienten vorkommen, die einen viralen Durchbruch während der Therapie erlitten haben, als in nicht behandelten Patienten (Cento et al. 2013). Eine Auswahl dieser Mutationen wurde mit dem phänotypischen Assay zur Resistenzbestimmung auf ihre tatsächliche Bedeutung auf die Resistenzentwicklung getestet.

Die Mutationen $rtL229F/V$ wurden gehäuft in Lamivudin-behandelten Patienten zusammen mit den Mutationen $rtL180M$ und $rtM204V$ gefunden. Die Primärmutationen an der Position $rtM204$ verursachen bereits ohne weitere Mutationen eine sehr hohe Lamivudinresistenz, die außerhalb des Messbereichs des verwendeten phänotypischen Assays liegt. Eine Erhöhung der Lamivudinkonzentration war aufgrund der begrenzten Löslichkeit nicht möglich. Ein zusätzlicher Effekt der Mutationen $rtL229F/V$ wäre daher nicht nachzuweisen gewesen. Aus diesem Grund wurden die $rtL229F/V$ in Kombination mit den Mutationen $rtL180M$ und $rtM204V$ nur auf ihren Einfluss auf die Kreuzresistenz gegen Entecavir getestet. Für die Klone mit allen drei Mutationen wurde eine deutlich schwächere Entecavirresistenz als für die Klone ohne eine zusätzliche Mutation an der Position $rtL229F/V$ ermittelt (Abbildung 3.21).

Drei Isolate mit der Primärmutation $rtM204I$, die im Rahmen des HOPE-Projekts phänotypisiert wurden, wiesen ein ähnliches Entecavir-Resistenzprofil auf (Tabelle 3.3: RK 83-2, BW108-5, BW 113-1). Eines dieser Isolate enthielt die Mutation $rtL229M$, die anderen beiden wiesen keine Mutation an der entsprechenden Position auf. Austausch an der Position $rtL229$ könnten also verantwortlich für eine verminderte Resistenz gegen Entecavir sein. Dass die Mutationen auf die Lamivudinresistenz einen gegenteiligen Effekt haben ist aber als eher unwahrscheinlich anzusehen.

Die Mutation $rtM309K$ wurde ebenfalls zusammen mit den Mutationen $rtL180M$ und $rtM204V$ gefunden. Ihr Einfluss auf die Resistenz konnte allerdings direkt getestet werden, da sie in Entecavir-behandelten Patienten gehäuft auftrat. Ein Einfluss auf die Entecavirresistenz wurde bei dieser Mutation jedoch nicht festgestellt (Abbildung 3.22). Im Gegensatz zu den Mutationen $rtL229F/V$ liegt die Mutation $rtM309K$ nicht innerhalb einer der sieben katalytischen Subdomänen der Reversen Transkriptase (Ghany und Liang 2007). Alle bisher beschriebenen Resistenzmutationen sind Teil einer dieser Subdomänen. Der fehlende Effekt der Mutation $rtM309K$ auf die Resistenzbildung passt daher in das bisherige Muster.

Die Mutation $rtS78T$ wurde alleine und zusammen mit der $rtA181V$ gehäuft in Adefovir-behandelten Patienten gefunden. Sie verursachte alleine und in Kombination mit der Mutation $rtA181V$ jedoch keine Adefovirresistenz (Abbildung 3.23). Problematisch bei der Phänotypisierung war hier, dass auch die

Mutation rtA181V alleine keine Adefovirresistenz verursachte, obwohl es sich hierbei um eine bekannte Resistenzmutation handelt. Der fehlende Effekt der Mutation rtA181V wurde auch beim Isolat FvB 170-3 (Abbildung 3.18) sowie in der Ringstudie (Tabelle 3.7) festgestellt. Eine sinnvolle Beurteilung der Mutationskombination rtS78T und rtA181T war daher nicht möglich. Die Tatsache, dass auch für die Mutation rtS78T alleine keine Resistenz festgestellt wurde, lässt die Vermutung zu, dass die Mutation wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Adefovirresistenz hat. Für eine verlässlichere Aussage wären jedoch weitere Tests mit geeigneten Kontrollen nötig.

Insgesamt ließ sich die Bedeutung der Mutationen für die Resistenzbildung in keinem der Fälle bestätigen. Für die Mutation rtM309K konnte eine Beteiligung an der Resistenzentwicklung sicher ausgeschlossen werden, während bei den Mutationen rtL229F/V sogar indirekt ein sensibilisierender Effekt festgestellt wurde. Insgesamt erscheint deshalb eine Bedeutung der in der Studie gefundenen Mutationen für die Resistenzbildung eher unwahrscheinlich.

4.6 Ursache für die hohen Resistenzen des HBV-Isolats FvB 150-1

Das multiresistente HBV-Isolat FvB 150-1 zeigte eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir (Geipel 2011). Es stammt aus einem Patienten, der vor Beginn seiner Tenofovirtherapie bereits mit Lamivudin und anschließend mit Adefovir behandelt wurde. Er zeigte ein ungewöhnlich langsames Ansprechen auf die Tenofovirtherapie (Abbildung 3.24). Solch ein vermindertes Ansprechen von Adefovir-vorbehandelten Patienten auf die Tenofovirtherapie wurde bereits von van Bömmel et al. (2010) in einer retrospektiven Studie beschrieben. Um ein genaueres Bild der Resistenzentwicklung der Quasispezies dieses Patienten zu erhalten, wurden Ganzgenome kloniert und analysiert.

Die Population der Quasispezies zu Beginn der Tenofovirtherapie ließ sich durch eine Stammbaumanalyse (Abbildung 3.25) und anhand ihrer Mutationen (Tabelle 3.8) in zwei Gruppen einteilen (blau und grün). Von diesen Gruppen hatte sich die blaue während der ersten 33 Monate unter Tenofovirtherapie durchgesetzt (Abbildung 3.25 und Tabelle 3.9). Interessanterweise wurde zu Beginn der Tenofovirtherapie neben der Mutation rtA181V in einem Teil der blauen Klone zusätzlich die Mutation rtN236T gefunden, letztere konnte sich allerdings unter der Therapie mit Tenofovir nicht durchsetzen. Die Mutationen rtA181V und rtN236T stellen die beiden bekannten Primärmutationen für eine Resistenz gegen Nukleotidanaloga dar (Zoulim und Locarnini 2013), wobei sich ihre Wirkung beim Vorhandensein beider Mutation addiert (Geipel 2011). Die Mutation rtN236T verursacht außerdem eine stärkere Resistenz gegen Tenofovir als die Mutation rtA181V (Ghany und Liang 2007). Die rtN236T hätte also theoretisch unter der Tenofovirtherapie erhalten bleiben müssen.

Der Genotyp des ursprünglichen Isolats 150-1 wurde nicht noch einmal gefunden. Die Erwartung in der zweiten Abnahme nach dem Wiederanstieg der Viruslast gehäuft das Mutationsmuster eines hoch resistenten Isolats (z.B. 150-1) zu finden, wurde nicht erfüllt (Abbildung 3.26). Dies lässt vermuten, dass der Patient zu diesem Zeitpunkt das Tenofovir nicht konsequent eingenommen hatte, so dass der selektive antivirale Druck hier nicht mehr bestand. Möglicherweise führte gerade dies zur Selektion von Varianten von geringerer Resistenz gegenüber Tenofovir.

Auch alle anderen Isolate zeigten deutlich geringere Resistenzen als das ursprüngliche Isolat. (Abbildung 3.26). Der Klon 1-08 war dem Isolat 150-1 genotypisch am ähnlichsten. Es fehlte ihm jedoch unter anderem die Mutation rtN236T. Hierbei handelt es sich, wie bereits erwähnt, um eine bekannte Resistenzmutation. Daher wurde vermutet, dass diese Mutation an der Ausbildung der hohen Resistenzen

beteiligt sein könnte. Diese Annahme konnte mit den phänotypischen Daten des Klon 1-08-A, in den die Mutation rtN236T mittels ortsspezifischer Mutagenese eingefügt wurde, bestätigt werden (Abbildung 3.27).

Isolate mit den Mutationen rtA181T und rtN236T zeigen jedoch normalerweise lediglich eine fünf- bis zehnfache Resistenz im Vergleich zum Wildtyp (Ghany und Liang 2007, Geipel 2011). Daher konnten diese beiden Mutationen allein nicht für die hohen Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir des Isolats 150-1 ($RF_{50} = 41,5$ bzw. 28,2) verantwortlich sein. Aus der Masterarbeit von Pia Seiz (2011) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. D. Glebe war bereits bekannt, dass die ursächlichen Mutationen nicht ausschließlich innerhalb der Reversen Transkriptase liegen können. Mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten genotypischen Analyse wurden Mutationen in der RNaseH-Domäne als Ursache für die Resistenz ausgeschlossen, da in dieser Domäne lediglich Polymorphismen gefunden wurden. Eine funktionelle Bedeutung der Spacerdomäne kann aufgrund ihrer allgemein hohen Variabilität und bisher nicht nachweisbaren Funktion als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Daraus folgt, dass die für die hohen Resistenzen verantwortlichen Mutationen wahrscheinlich in der Primerdomäne liegen müssen.

In der Primerdomäne des Isolats 150-1 wurden die Mutationen T76S und K90E gefunden (Tabelle 3.8). Der Austausch H73N stellte sich im Vergleich mit allen Genotypen als Polymorphismus heraus und wurde bei der Suche nach der verantwortlichen Resistenzmutation daher nicht mehr in Betracht gezogen. Im Gegensatz zur Mutation T76S, die nur in der blauen Gruppe gefunden wurde, war die Mutation K90E in allen sequenzierten Klonen vorhanden. Der Klon 1-12 der grünen Gruppe, welcher neben der K90E auch die Mutationen rtA181V und rtN236T enthielt, zeigte jedoch im Vergleich zum Isolat 150-1 signifikant niedrigere Resistenzen. Die Mutation K90E konnte also als Ursache für die hohen Resistenzen ebenfalls ausgeschlossen werden. Nach dem Ausschlussprinzip blieb daher nur die Mutation T76S als potentielle Resistenzmutation übrig. Sie wurde deshalb mittels ortsspezifischer Mutagenese aus dem hoch resistenten Klon 1-08-C entfernt. Der daraus resultierende Klon 1-08-D zeigte deutlich geringere Resistenzen im Vergleich zum Klon 1-08-C und dem Isolat 150-1. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mutation T76S um eine bisher unbekannte Resistenzmutation handelt. Eine besondere Bedeutung erhält diese Entdeckung, da es die erste nachgewiesene Resistenz-assoziierte Mutation ist, die sich außerhalb der Reversen Transkriptase der HBV-Polymerase HBV befindet. Sie verursacht zusammen mit den Mutationen rtA181V und rtN236T eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegen die klinisch sehr bedeutsamen Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir. Diese Ergebnisse konnten von Pia Seiz im Rahmen ihrer Promotion in einer parallelen, unabhängigen Analyse bestätigt werden (Daten noch unveröffentlicht). Auch beim HIV gibt es Resistenzmutationen, die außerhalb der Reversen Transkriptase liegen. Bis jetzt wurden im HIV jedoch nur Mutationen in der RNaseH-Domäne und nicht wie hier beim HBV in der Primerdomäne gefunden (Lengruher et al. 2011).

Über die genauen molekularen Auswirkungen der Mutation T76S lässt sich nur spekulieren, da kein verlässliches dreidimensionales Strukturmodell für die Primerdomäne der HBV-Polymerase verfügbar ist. Die existierenden 3D-Modelle der Reversen Transkriptase beruhen auf der Homologie zur HIV-Polymerase. Der hierfür nötige hohe Grad der Homologie ist jedoch für die Primerdomäne nicht gegeben. Eventuell wird durch den Austausch an der Position T76 die Tertiärstruktur der Polymerase so verändert, dass dies auch einen Einfluss auf die Reverse Transkriptase hat. Beim Priming der Replikation simuliert die Hydroxylgruppe des Tyrosins an der Position 63 der Primerdomäne das 3'-Ende einer Nukleinsäure (Protein-Priming). Durch die Reverse Transkriptase werden dort die vier Nukleotide TGAA angehängt (Lanford et al. 1995). Die aufgrund der Mutation T76S veränderte Tertiärstruktur könnte den Einbau des natürlichen Substrats gegenüber den Adenosinanaloga Adefovir und Tenofovir begünstigen, sodass es anschließend zu weniger Kettenabbrüchen kommt. Diese Theorie würde auch die für die Mutationen

rtA181V und rtN236T ungewöhnliche Entecavirresistenz des Isolats FvB 150-1 (4.4.5) erklären, da es sich bei Entecavir um ein Analogon des Guanosins handelt.

Die umfassende genotypische Analyse in dieser Arbeit hat ergeben, dass die Position T76S in der Primerdomäne der HBV-Polymerase über alle Genotypen hinweg hoch konserviert ist (Tabelle A.3). Die Mutation wurde in der umfangreichen HBV-Sequenz-Onlinedatenbank HBVdb (*The Hepatitis B Virus database*, Hayer et al. 2013), mit über 4.000 Polymerasesequenzen kein zweites Mal gefunden. Im Hinblick auf die Resistenzentwicklung wurde bis jetzt immer nur die Reverse Transkriptase genotypisch charakterisiert. Daher sind nur wenige Sequenzen der Primerdomäne aus chronisch infizierten Patienten vorhanden. So umfasst zum Beispiel die Onlinedatenbank HBVrtDB der Universität Stanford ausschließlich die Reverse Transkriptase (Rhee et al. 2010). Dieser Umstand verdeutlicht warum die Mutation kein zweites Mal entdeckt werden konnte. Hier ist ein Umdenken notwendig, in Zukunft sollte stets die vollständige Polymerase in Bezug auf die Resistenzentwicklung charakterisiert werden.

4.7 Ausblick

Das hier etablierte System aus der transienten Transformation von 1.5-fachen Überlängenkonstrukten und dem Replikationsnachweis mit der dsDNase kann genutzt werden, um den Einfluss der Promotorbereiche auf die virale Replikation zu charakterisieren. Wie beschrieben ist mit dieser Methodenkombination nun eine einfache und schnelle Analyse einer großen Anzahl an Promotorvarianten möglich.

Die Ergebnisse des HOPE-Projekts haben das vorherrschende Bild der existierenden Resistenzmutationen weitestgehend bestätigt. Es wurden jedoch auch neue Fragen aufgeworfen auf die bis jetzt keine sichere Antwort gefunden wurde. Dazu gehört die Frage nach den Mutationen, die für die sehr heterologen Entecavirresistenzen bei klassischen Lamivudin-Resistenzmutationsmustern ursächlich sind. Hier lohnt auf jeden Fall eine Analyse einer höheren Stichprobenzahl, um am Ende bestimmte bisher nicht beachtete Austausche mit den unterschiedlichen Ausprägungen der Entecavirresistenz korrelieren zu können. Gleiches sollte auch für die Kreuzresistenzen gegen die beiden Nukleotidanaloga auf der Grundlage der Mutationen rtM204I/V sowie das verminderte Ansprechen auf hohe Entecavirkonzentrationen durchgeführt werden.

Das Isolat FvB 170-3 sollte aufgrund seiner ungewöhnlichen Entecavirresistenz einer ausführlichen Charakterisierung unterzogen werden. Wie für das multiresistente Isolat FvB 150-1 bereits durchgeführt, sollten als erstes sämtliche Polymorphismen durch einen Sequenzvergleich ausgeschlossen werden. Die verbleibenden Mutationen müssen anschließend phänotypisch getestet werden.

Das Isolat FvB 150-1 wurde bis jetzt nur auf die Ursache für seine hohe Resistenz gegen die Nukleotidanaloga untersucht. Es muss jedoch überprüft werden, ob die Mutation T76S ebenfalls einen Einfluss auf die ungewöhnliche Entecavirresistenz hat oder ob hierfür andere Mutationen verantwortlich sind.

Alle genotypischen und phänotypischen Charakterisierungen zur HBV-Resistenzentwicklung dürfen in Zukunft nicht mehr auf die Reverse Transkriptase beschränkt werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mutation T76S in der Primerdomäne eine entscheidende Bedeutung für die Resistenzentwicklung hat. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass auch weitere Austausche außerhalb der Reversen Transkriptase einen Einfluss auf die Resistenzen gegen Nukleos(t)idanaloga haben können. Eventuell finden in diesen bisher nicht charakterisierten Bereichen auch Ursachen für die anderen ungeklärten Resistenzentwicklungen.

Literaturverzeichnis

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB** (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615-616.
- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD** (1998) Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 27:1670-1677.
- Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ** (1971) New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2:1225-1227.
- Amini-Bavil-Olyaei S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F** (2009) The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology* 49:1158-1165.
- Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S** (2003) Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 125:292-297.
- Arbuthnot P, Kew M** (2001) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 82:77-100.
- Bartenschlager R, Junker-Niepmann M, Schaller H** (1990) The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* 64:5324-5332.
- Bartenschlager R, Schaller H** (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J* 7:4185-4192.
- Bartenschlager R, Schaller H** (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11:3413-3420.
- Bartholomeusz A, Schaefer S** (2004) Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 14:3-16.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS** (1981) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2:1129-1133.
- Berger J, Hauber J, Hauber R, Geiger R, Cullen BR** (1988) Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66:1-10.
- Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R** (2003) Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22:5093-5107.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S** (1965) A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA* 191:541-546.
- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI** (1967) A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66:924-931.
- Bock CT, Schranz P, Schröder CH, Zentgraf H** (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 8:215-229.
- Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH** (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* 13:2273-2279.
- Cento V, Van Hemert F, Neumann-Fraune M, Mirabelli C, Di Maio VC, Salpini R, Bertoli A, Micheli V, Gubertini G, Romano S, Visca M, De Sanctis GM, Berkhout B, Marino N, Mazzotta F, Cappiello G, Spano A, Sarrecchia C, Ceccherini-Silberstein F, Andreoni M, Angelico M, Verheyen J, Perno CF, Svicher V** (2013) Anti-HBV treatment induces novel reverse transcriptase mutations with reflective effect on HBV S antigen. *J Infect* 67:303-312.
- Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frolich K, Will H** (1999) A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* 262:39-54.

- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH** (2006) Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 295:65-73.
- Cougot D, Neuveut C, Buendia MA** (2005) HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 34 Suppl 1:S75-78.
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P** (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77:943-950.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M** (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695-698.
- Delaney WEt, Locarnini S, Shaw T** (2001) Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother* 12:1-35.
- Delaney WEt, Yang H, Westland CE, Das K, Arnold E, Gibbs CS, Miller MD, Xiong S** (2003) The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* 77:11833-11841.
- Drexler JF, Geipel A, Konig A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Muller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stocker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C** (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16151-16156.
- Dryden KA, Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari FV, Yeager M** (2006) Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* 22:843-850.
- Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepo C, Zoulim F** (2005) Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 34 Suppl 1:S34-43.
- European Association for the Study of the Liver (EASL)** (2012) EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 57:167-185.
- Fung SK, Andreone P, Han SH, Rajender Reddy K, Regev A, Keeffe EB, Hussain M, Cursaro C, Richtmyer P, Marrero JA, Lok AS** (2005) Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol* 43:937-943.
- Ganem D** (1991) Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 168:61-83.
- Ganem D, Prince AM** (2004) Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-1129.
- Ganem D, Varmus HE** (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 56:651-693.
- Geipel A** (2011) Phänotypische Charakterisierung klinisch relevanter Hepatitis-B-Virus-Mutanten. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Geipel A** (2012) Phenotypic evaluation of HBV resistance against Lamivudine reveals an unexpected resistance against Adefovir and Entecavir. Poster präsentiert auf dem International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oxford England.
- Gerlich WH, Robinson WS** (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801-809.
- Ghany M, Liang TJ** (2007) Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 132:1574-1585.

- Ghosh S, Banerjee P, RoyChoudhury A, Sarkar S, Ghosh A, Santra A, Banerjee S, Das K, Dwibedi B, Kar SK, Rao VG, Bhat JT, Singh N, Chowdhury A, Datta S** (2010) Unique hepatitis B virus subgenotype in a primitive tribal community in eastern India. *J Clin Microbiol* 48:4063-4071.
- Girones R, Miller RH** (1989) Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170:595-597.
- Glebe D, Bremer CM** (2013) The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 33:103-112.
- Glebe D, Urban S** (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13:22-38.
- Günther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H** (1995) A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69:5437-5444.
- Hayer J, Jadeau F, Deleage G, Kay A, Zoulim F, Combet C** (2013) HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Res* 41:D566-570.
- He B, Fan Q, Yang F, Hu T, Qiu W, Feng Y, Li Z, Li Y, Zhang F, Guo H, Zou X, Tu C** (2013) Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg Infect Dis* 19:638-640.
- Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS** (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 21:666-672.
- Hu J, Seeger C** (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1060-1064.
- Huang J, Liang TJ** (1993) A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol* 13:7476-7486.
- Huovila AP, Eder AM, Fuller SD** (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 118:1305-1320.
- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ** (2006) Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 130:678-686.
- Innaimo SF, Seifer M, Bisacchi GS, Standring DN, Zahler R, Colonna RJ** (1997) Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1444-1448.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H** (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 9:3389-3396.
- Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O, Thraenhart O** (2002) Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol* 190:189-197.
- Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS** (1973) DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 12:995-1005.
- Kenney JM, von Bonsdorff CH, Nassal M, Fuller SD** (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* 3:1009-1019.
- Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, Flaherty J, Snow-Lampart A, Marcellin P, Borroto-Esoda K, Miller MD** (2013) No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*.
- Köck J, Rosler C, Zhang J, Blum HE, Nassal M, Thoma C** (2012) Human hepatitis B virus production in avian cells is characterized by enhanced RNA splicing and the presence of capsids containing shortened genomes. *PLoS One* 7:e37248.
- Köck J, Schlicht HJ** (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* 67:4867-4874.
- Köhler W, Schachtel GA, Voleske P** (2007) *Biostatistik: eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*. Berlin: Springer.

- Lambert C, Doring T, Prange R (2007)** Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* 81:9050-9060.
- Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS (1977)** Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* 23:368-376.
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, 3rd, Rico-Hesse R (1998)** Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5757-5761.
- Lanford RE, Notvall L, Beames B (1995)** Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J Virol* 69:4431-4439.
- Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, Kapur AJ, Colonno RJ, Tenney DJ (2007)** Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* 81:3992-4001.
- Laskus T, Rakela J, Persing DH (1994)** The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants. *Virology* 200:809-812.
- Lavanchy D (2004)** Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 11:97-107.
- Lavanchy D (2005)** Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 34 Suppl 1:S1-3.
- Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D (2008)** Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol* 10:122-133.
- Lengruber RB, Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Baumann J, Santos AF, Pathak VK, Soares MA (2011)** Phenotypic characterization of drug resistance-associated mutations in HIV-1 RT connection and RNase H domains and their correlation with thymidine analogue mutations. *J Antimicrob Chemother* 66:702-708.
- Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C (2007)** Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 46:254-265.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS (1980)** A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2941-2945.
- Mason WS, Burrell CJ, Casey J, Gerlich WH, Howard CR, Kann M, Lanford R, Newbold J, Schaefer S, Taylor JM, Will H (2005)** Family Hepadnaviridae. In: *Virus Taxonomy Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (C.M., F, M.A., M, J., M, U., D and L.A., B, eds), pp 373-384 Amsterdam: Elsevier.
- Mason WS, Seal G, Summers J (1980)** Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36:829-836.
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982)** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42:3858-3863.
- Nassal M (1992)** The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 66:4107-4116.
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S (1995)** The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 69:3350-3357.
- Nilsen IW, Overbo K, Havdalen LJ, Elde M, Gjellesvik DR, Lanes O (2010)** The Enzyme and the cDNA Sequence of a Thermolabile and Double-Strand Specific DNase from Northern Shrimps (*Pandalus borealis*). *PLoS One* 5.

- Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO** (2004) Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47:289-309.
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H** (1996) Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4398-4402.
- Ogata N, Fujii K, Takigawa S, Nomoto M, Ichida T, Asakura H** (1999) Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 59:270-276.
- Papworth C, Bauer JC, Braman J, Wright DA** (1996) Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* 9:3-4.
- Park GT, Yi YW, Choi CY, Rho HM** (1997) A negative regulatory element and its binding protein in the upstream of enhancer II of hepatitis B virus. *DNA Cell Biol* 16:1459-1465.
- Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C, Roingeard P** (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 81:3842-3851.
- Patterson SJ, George J, Strasser SI, Lee AU, Sievert W, Nicoll AJ, Desmond PV, Roberts SK, Locarnini S, Bowden S, Angus PW** (2011) Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. *Gut* 60:247-254.
- Perrillo R** (2009) Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. *Hepatology* 49:S103-111.
- Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HC, Jr., Lindsay K, Payne J, Dienstag JL, O'Brien C, Tamburro C, Jacobson IM, et al.** (1990) A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 323:295-301.
- Prince AM** (1968) An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60:814-821.
- Rabe B, Glebe D, Kann M** (2006) Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol* 80:5465-5473.
- Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M** (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9849-9854.
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H** (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64:613-620.
- Rall LB, Standring DN, Laub O, Rutter WJ** (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 3:1766-1773.
- Reynaud L, Carleo MA, Talamo M, Borgia G** (2009) Tenofovir and its potential in the treatment of hepatitis B virus. *Ther Clin Risk Manag* 5:177-185.
- Rhee SY, Margeridon-Thermet S, Nguyen MH, Liu TF, Kagan RM, Beggel B, Verheyen J, Kaiser R, Shafer RW** (2010) Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. *Antiviral Res* 88:269-275.
- Rinker F** (2013) Klonierung und funktionelle Analyse von Hepatitis-B-Virus Genomen des internationalen WHO-HBV-Genotyp-Panels Masterarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Robinson WS** (1977) Genome of Hepatitis-B virus. *Annual Review of Microbiology* 31:357-377.
- Robinson WS** (1991) Hepadnaviridae and their replication. In: *Fundamental Virology* 2nd Ed (Fields, BN and Knipe, DN, eds), pp 198-1021 New York: Raven Press.
- Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL** (1974) DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 14:384-391.

- Robinson WS, Greenman RL** (1974) DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 13:1231-1236.
- Sampah ME, Shen L, Jilek BL, Siliciano RF** (2011) Dose-response curve slope is a missing dimension in the analysis of HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7613-7618.
- Sattler F, Robinson WS** (1979) Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 32:226-233.
- Schäfer S** (2007) Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 13:14-21.
- Schäfer S, Glebe D, Gerlich WH** (2009) Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae). In: *Medizinische Virologie* (Doerr, HW and Gerlich, WH, eds), pp 345-372 Stuttgart: Thieme.
- Schulze A, Gripon P, Urban S** (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46:1759-1768.
- Seeger C, Ganem D, Varmus HE** (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232:477-484.
- Seifer M, Zhou S, Standring DN** (1993) A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol* 67:249-257.
- Seitz S, Urban S, Antoni C, Bottcher B** (2007) Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J* 26:4160-4167.
- Seiz P** (2011) Antivirale Resistenzprofile von Hepatitis-B-Virus Mutanten in vitro. Masterarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Severini A, Liu XY, Wilson JS, Tyrrell DL** (1995) Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1430-1435.
- Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S** (2006) HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol* 44:593-606.
- Shaw T, Locarnini S** (2004) Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2:853-871.
- Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF** (2001) Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 33:751-757.
- Summers J, Mason WS** (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415.
- Summers J, O'Connell A, Millman I** (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:4597-4601.
- Summers J, Smolec JM, Snyder R** (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4533-4537.
- Sureau C, Salisse J** (2013) A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 57:985-994.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A** (2001) Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect* 14:325-334.

- Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Pokornowski K, Yu CF, Angus P, Ayres A, Bartholomeusz A, Sievert W, Thompson G, Warner N, Locarnini S, Colonna RJ** (2004) Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3498-3507.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A** (1985) The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495.
- Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, Shafritz DA** (1988) The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 167:630-633.
- Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J** (1986) Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47:451-460.
- van Bömmel F, de Man RA, Wedemeyer H, Deterding K, Petersen J, Buggisch P, Erhardt A, Huppe D, Stein K, Trojan J, Sarrazin C, Bocher WO, Spengler U, Wasmuth HE, Reinders JG, Moller B, Rhode P, Feucht HH, Wiedenmann B, Berg T** (2010) Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* 51:73-80.
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, Harrison TJ** (1988) The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 69 (Pt 6):1383-1389.
- Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L, Villeneuve JP, Trepo C, Zoulim F** (2007) Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *J Hepatol* 46:531-538.
- Villet S, Pichoud C, Billioud G, Barraud L, Durantel S, Trepo C, Zoulim F** (2008) Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* 48:747-755.
- Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, Shaw T** (2007) The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2285-2292.
- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto, Verschoor EJ** (1999) A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 73:7860-7865.
- World Health Organization (WHO)** (2013) Hepatitis B - Fact sheet N°204. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>
- Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J** (1993) Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 119:312-323.
- Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS** (1990) In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175:255-261.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W** (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:e00049.
- Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, Zhang J, Chen PJ, Xia NS** (2010) Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One* 5:e9297.
- Zoulim F, Locarnini S** (2009) Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137:1593-1608 e1591-1592.
- Zoulim F, Locarnini S** (2013) Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance. *Liver Int* 33 Suppl 1:116-124.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
bp	Basenpaare
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA (<i>covalent closed circular DNA</i>)
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DR1	direkte Sequenzwiederholung 1 (<i>direct repeat 1</i>)
Dr2	direkte Sequenzwiederholung 2 (<i>direct repeat 2</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EBNA-1	nukleäres Antigen des Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
F	Fitness
FAM	6-Carboxyfluorescein
FDU	Enzymeinheit der <i>FastDigest</i> Restriktionsenzyme (<i>fast digest unit</i>)
FKS	Fötale Kälberserum
GRE	Glucocorticoid-Responsiveelement
GT	Genotyp
HBcAG	Kernantigen des Hepatitis-B-Virus (<i>hepatitis B core antigen</i>)
HBcAg	frühes Hepatitis B Antigen (<i>hepatitis B early antigen</i>)
HBsAg	Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus (<i>hepatitis B surface antigen</i>)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HOPE	Hepatitis B Therapie: Optimierung durch phänotypische Evaluation
IC ₅₀	zu 50 % inhibitorische Konzentration
IC ₉₀	zu 90 % inhibitorische Konzentration
kb	Kilobase
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertoni
LHBs	großes Oberflächenproteine (<i>large hepatitis B surface protein</i>)
LPA	<i>Line Probe Assay</i>
MHBs	mittleres Oberflächenproteine (<i>middle hepatitis B surface protein</i>)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NRE	negativ regulatorischen Element
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotid

Nukleos(t)idanalogen	Nukleosid- und/oder Nukleotidanalogen
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pgRNA	prägenomische RNA
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
RF ₅₀	Resistenzfaktor zur IC ₅₀
RF ₉₀	Resistenzfaktor zur IC ₉₀
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEAP	humane plazentale alkalische Phosphatase (<i>secreted embryonic alkaline phosphatase</i>)
SHBs	kleines Oberflächenproteine (<i>small hepatitis B surface protein</i>)
Sign.	Signifikanz
SOC	super optimales Nährmedium mit Katabolitrepression (<i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
T _A	Anlagerungstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamine
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
v/v	Volumenanteile/Volumen (<i>volume/volume</i>)
w/v	Gewichtsanteile/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

Anhang

Tabelle A.1: Funktionstest der dsDNase-PCR mit dem Zusatz von Mn²⁺. Als Template diente der normale PCR-Standard aus Zellkulturüberstand. Die dsDNase-PCR wurde mit und ohne den Zusatz von 1 mM MnCl₂ durchgeführt.

eingesetzte GE	dsDNase-PCR	dsDNase-PCR + 1 mM Mn ²⁺
1 × 10 ⁵	1,00 × 10 ⁵	nicht quantifizierbar
1 × 10 ⁴	9,97 × 10 ³	nicht quantifizierbar
1 × 10 ³	1,00 × 10 ³	nicht quantifizierbar
1 × 10 ²	8,74 × 10 ²	nicht quantifizierbar
1 × 10 ¹	1,13 × 10 ¹	nicht quantifizierbar
negativ Kontrolle	nicht quantifizierbar	nicht quantifizierbar

Tabelle A.2: Mutationen der Isolate des HOPE-Projekts. Die Mutationen wurden mit geno2pheno [hbv] 2.0 (<http://hbv.geno2pheno.org>) bestimmt. Die bekannten Resistenzmutationen sind fett dargestellt.

Isolat	Reverse Transkriptase	Oberflächenproteine
WT	A21S, F122L, H124N, Q130P, N131D, D263E, V278I	T125M
BW 103-2	D7H, I53S, L180M , C188S, M204I , L217R, S219A, M336L	S45A, V180L, V184A, W196L, S207N, L209V, S210R
BW 107-3	L80I , N124H, N134D, M204I , A222T, V253I, T259S, M271L	K122R, T143M, W196L, F200Y, M213I
BW 108-3	L80I , Y135S, L180M , M204I , N248H	S53L, T127P, W196L
BW 108-5	L80I , Y135S, M204I , N248H	T127P, W196L
BW 111-3	H13Y, R18S, Y54H, L91I, S106T, L115V, S117C, I188S , SKKCI-119 , R120K, I121D, F122C, N123I, Q125R, T128S, R138S, N139S, I169L , A181S , A194S, F221Y, V224I, N248H, Y257H, D263E, L336R	G10A, G18V, R24K, L49R, I86T, Y100S, L109V, 110-SKKCI-111, G112R, S113T, S114A, T115S, S117G, A128V, Q129P, G130V, T131A, Y134F, K160N, W172C, S174N, V177A, P178Q, L213I
BW 113-1	H13Y, I16T, A21S, Y54H, L80V , L91I, N118D, F122L, Q130P, Y135S, M204I , Q215S, D263E, I266V, E271T	F8L, R24K, Q30R, T127P, Y134F, W196L, Y206S, S207R
BW 113-5	H13Y, I16T, A21S, Y54H, L80I , L91I, N118D, F122L, Q130P, Y135S, M204I , Q215S, D263E, I266V, E271T	F8L, R24K, Q30R, T127P, W196L, Y206S, S207R
BW 121-5	H13Y, I16T, F122W, H124Y, Y135S, Q149K, Q215S, N236T , N248H, M250L , C256S	F8L, N40S, S114G, T127P, S207R
BW 125-2	A21S, V112A, F122L, Q130P, Y135A, L145M, Q149K, R153W, I163V, V214A, Q215A, C256S, D263E, I266V, Q267L	Q101R, T127P, T189I, S204N, Y206L, S207R, I208T
FvB 170-3	Y54H, R110G, T128N, Y135S, I163T, A181V , S219A, F221Y, N248H, C256S, K270R	P120T, T127P, S155P, L173F, S210R, L213I, L215R
	Y54H, R110G , Y135S, A181V, S219A, F221Y, N248H, C256S, K270R	

Isolat	Reverse Transkriptase	Oberflächenproteine
FvB 84-2	V173L, L180M, M204V , L217R	E164D, I195M, L209V
MS 10-3	H13N, T54N, L217R, S219A, S332R, K333Q	P46T, A194V, L209V, S210R
MS 18-3	V56M, L91I, H126Q, Y135S, Q149K, R153W, I169L, V173L, L180M, M204V , P237T, N238T, N248H, Y257W, Q267H, Y305F	I92T, Q101R, T118K, T127P, P142L, K160N, E164V, V177A, I195M, V224G
MS 19-2	V112I, L140I, M145L, W153C, V173L, L180M, M204V , L217R	Q101H, M103I, K122R, N131K, G145A, E164D, V168A, V177A, P178Q, I195M, L209V, C221Y
RK 182-2	V142I, V173L, L180M , C188S, M204I	M133I, E164D, F179L, W196L
RK 194-5	Y135S, N139S, L180M, S202G, M204V , N248H, M309K, S317A, A329T	T127P, T131A, A166G, I195M
RK 22-15	L91I, G127R, Y135S, A181T , L231V, N248H	T127P, W172L
RK 22-20	L91V, Y135S, T150P, A181T, A194V , L231V, N248H	I82M, T127P, K141N, W172L, L186F
RK 266-1	Y141S, I269L, A317S, N337H	M133L, L175S
RK 5-5	S78T, L91I, A113G, Y135S, L231V, N248H	C69*, P105A, T127P, D144G, L209W
RK 83-2	I53S, L180M, M204I , V207L, L217R, S219A, L229M, H271Q, K333Q	N40S, S45A, W196L, M198I, S207N, L209V, S210R, P217L, F220L
VS 1-4	I16T, A21S, A38K, Y54H, F122L, Q130P, Y135S, V142E, L180M , T184A, M204V , V214A, N238H, N248H, C256S, D263E, I266R	F8L, Q30K, N40S, T127P, Y134S, I195M, Y206H, S207N, I208T
VS 1-5	I16T, A21S, A38K, Y54H, F122L, Q130P, Y135S, V142E, V173M, L180M , T184A, M204V , V214A, N238H, N248H, C256S, D263E, I266R, W284G	F8L, Q30K, N40S, T127P, Y134S, I195M, Y206H, S207N, I208T
VS 2-10	Y111S, R138W, M204I , Q267K	M103L, A128V, Q129H, W196*
VS 2-12	I16T, M204I , L217R	F8L, W196L, L209V
WH 2-16-1	V27A, I53S, M204I , L217R, Y221F	F19L, G44E, S45A, W196L, L209V, I213L

Tabelle A.3: Häufigkeit der Aminosäureaustausche

Domäne	Position	Häufigkeit in Genotyp D	Häufigkeit in allen Genotypen
Primer	45	95 % N, 4 % D, 1 % K	81 % N, 8 % L, 6 % D
	73	98 % H, 1 % N, 1 % E	46 % E, 19 % H, 14 % K, 11 % D, 9 % N, 1 % Q
	76	100 % T	100 % T
	90	91 % K, 8 % N, 1 % Y	52 % N, 25 % D, 18 % K, 2 % S, 2 % T, 1 % H
	169	99 % C, 1 % F	97 % C, 2 % F, 2 % Y
Spacer	211	100 % R	100 % R
	239	100 % T	52 % T, 35 % S, 12 % P, 1 % A
	245	100 % G	100 % G
	250	99 % G, 1 % S	95 % G, 3 % S
	264	99 % C, 1 % R, 1 % Y	100 % C
	269	91 % P, 7 % T, 2 % A	79 % A, 17 % P, 2 % S
	273	95 % A, 4 % T, 1 % L	64 % A, 32 % T, 3 % K, 2 % E
	290	99 % A, 1 % T	94 % A, 3 % T, 2 % E
	294	98 % H, 1 % Q, 1 % Y	49 % H, 39 % N, 10 % C, 4 % S
	295	100 % F	36 % I, 33 % L, 24 % F, 7 % V
	302	99 % R, 1 % Q	79 % R, 20 % G, 1 % K
	306	99 % E, 1 % K	49 % E, 40 % Q, 10 % K
	310	97 % F, 1 % S, 2 % L	57 % F, 31 % L, 8 % S, 4 % P
Reverse Transkriptase	rt76	98 % N, 1 % S, 1 % D	96 % N, 4 % D
	rt109	99 % S, 1 % L	79 % S, 21 % P
	rt110	100 % R	99 % R, 1 % G
	rt118	97 % N, 2 % D, 1 % S	63 % N, 34 % T, 2 % D
	rt128	100 % T	95 % T, 3 % A, 1 % N
	rt142	94 % V, 4 % S, 1 % E, 1 % Y	100 % V
	rt164	98 % C, 2 % M	100 % C
	rt181	100 % A	100 % A
	rt219	99 % S, 1 % A	96 % S, 2 % A
	rt221	96 %, 4 % Y	50 % F, 50 % Y
	rt236	100 % N	100 % N
	rt249	100 % F	100 % F
	rt270	100 % K	100 % K
	rt315	100 % I	100 % I
	rt327	100 % Y	100 % Y
RNaseH	701	99 % H, 1 % N	99 % H
	726	100 % R	99 % R
	827	99 % V, 1 % I	100 % V
	828	99 % A, 1 % T	99 % A, 1 % T

Tabelle A.5: Charakterisierung der viralen Quasiespezies der Abnahme nach 33 Monaten Tenofovirtherapie inkl. der gefundenen Polymorphismen. Der Klon 150-1 stellt das ursprüngliche Isolat FvB 150-1 aus dem HOPE-Projekt dar. Die für die beiden Mutationsmuster charakteristischen Mutationen sind blau und grün hinterlegt dargestellt. Mutationen die in allen Klonen gefunden wurden sind grau und die für die Resistenz wahrscheinlich entscheidenden Mutationen sind rot hinterlegt dargestellt. Polymorphismen sind in grauer Schrift, Mutationen in schwarzer Schrift gehalten.

Domäne	Abnahme nach 33 Monaten Tenofovirtherapie										
	Klon 2-01	Klon 2-07	Klon 2-08	Klon 2-09	Klon 2-10	Klon 2-11	Klon 2-12	Klon 2-13	Klon 2-14	Klon 2-15	Klon 2-16
Primer	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N	H73N
	T76S		T76S								
	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E	K90E
	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R	H164R
Spacer	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K	E178K
				T239I					G245E		
	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T	A273T
											A277T
	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T	A290T
									H294L		
	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K	F295K
	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K	R302K
Reverse Transkriptase	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H	rtY54H
							rtS109P				
	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G	rtR110G
	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N	rtT128N
	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V	rtA181V
	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A	rtS219A
	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y	rtF221Y
	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H	rtN248H
	rtF249S										
rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	rtC256S	
rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	rtK270R	
rtI315L				rtI315L							
										rtY327F	
RNaseH	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A	V698A
	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I	M699I
									H701P		
	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I	L734I
	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y	F749Y
	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y	S787Y
											V827A
										A828T	

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 20. Dezember 2013

Lebenslauf

Lebenslauf wurde für die Veröffentlichung entfernt.

Danksagungen

Mein Dank geht an erster Stelle an **PD Dr. Dieter Glebe** für die Überlassung des spannenden Themas, für die Betreuung während der Promotion und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Albrecht Bindereif** für die Begutachtung dieser Arbeit sowie für die Vertretung meiner Promotion vor dem Fachbereich 08 für Biologie und Chemie.

Außerdem möchte ich mich bei **Prof. Dr. Wolfram H. Gerlich** und bei **Prof. Dr. Michael U. Martin** für die Bereitschaft bedanken als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Ich bedanke mich bei **Dr. Andreas Geipel** für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema und die generelle Unterstützung in Form von Ratschlägen und Diskussionen während der gesamten Promotion.

Ein ganz großes Dankeschön geht an das gesamte Institut für Medizinische Virologie und natürlich insbesondere an die Arbeitsgruppe Glebe. Ich möchte mich bei **Siggi, Alex, Corinna, Tina, Pia** und **Franzi** für die gute Zusammenarbeit und für die vielen lustigen Momente im Labor bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern**, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich auch während der Promotion immer unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts „Hepatitis B Therapie: Optimierung durch phänotypische Evaluation“ (HOPE-Projekt) finanziell vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert (BMBF Fördernummer 01ES0818 von Dieter Glebe), wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.