

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

Phänotypische Charakterisierung klinisch relevanter Hepatitis-B-Virus-Mutanten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
- Biologie -
der Justus-Liebig Universität Gießen
vorgelegt von
Dipl.-Biol. Andreas Geipel
Gießen 2011

Dekan: **Prof. Dr. Volkmar Wolters**

Gutachter: **Prof. Dr. Albrecht Bindereif**

PD Dr. Dieter Glebe

Tag der Disputation: 19.12.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Historische Einführung	1
1.2 Hepadnaviridae	2
1.2.1 Eigenschaften	2
1.2.2 Taxonomie	2
1.3 Epidemiologie und Übertragung	4
1.4 Morphologie	4
1.5 Genomstruktur	7
1.6 Viraler Replikationszyklus	8
1.7 Infektionsverlauf	11
1.8 Therapie	12
1.9 Resistenzentwicklung	16
1.10 Resistenz-Testsysteme	18
1.11 Ziele der Arbeit	19
2. Material	20
2.1. Geräte	20
2.2. Verbrauchsmaterial	20
2.3 Chemikalien, Pufferkomponenten, Medienzusätze	21
2.4 Enzyme und Kits	22
2.5 Plasmide und Primer	22
2.6 Patientenseren und Patientenisolat	25
2.7 Bakterien und Zellen	26
2.8 Puffer, Lösungen und Medien	27
3. Methoden	29
3.1 Aufreinigung der Virus-DNA aus Serum	29
3.2 Klonierung von Patientenisolaten in pCH9-3091	29
3.3 Plasmidpräparation	31
3.4 Transformation	31
3.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	31
3.6 Sequenzierung	32
3.7 Klonierungen mit In-Fusion HD Cloning Kit	32
3.7.1 Klonierung verschiedener Vektoren	32
3.7.2 Erstellung eines 1.1fach-Überlängenkonstrukts	33
3.8 Zellkultur	34
3.8.1 Auftauen von Zellen	34
3.8.2 Kultivieren von Zellen	34
3.8.3 Passagieren der Zellen	34
3.8.4 Transfektion der Zellen	35
3.8.4 Selektion der Zellen mit Puromycin	35
3.9 Herstellung der Nukleo(s)tidanaloga Stocklösungen	35
3.10 Real Time PCRs	36
3.10.1 X-PCR	36
3.10.2 HOPE-PCR	37
3.11 Phänotypischer Assay	37
3.11.1 Transfektion und Inkubation der Zellen	37

3.11.2 SEAP-Nachweis.....	38
3.11.2.1 SEAP-Standard und Negativkontrolle	38
3.11.2.2 Messung des SEAP-Signals	39
3.11.3 Aufreinigung der Überstände mit Freedom Evo 100/4D	39
3.11.4 Quantifizierung der DNA aus den Überständen	39
3.11.5 Auswertung der erhaltenen Daten	39
4. Ergebnisse	41
4.1 Entwicklung eines phänotypischen Assays für HBV	41
4.1.1 Etablierung des SEAP-Test und des 96-Well Zellkultursystems	41
4.1.2 Vergleich verschiedener Transfektionsreagenzien mit Hilfe von Reporterkonstrukten	42
4.1.3 Verringerung des plasmidbedingten Hintergrundsignals der Real-Time-PCR	43
4.1.4 Optimierung der Inkubationsdauer	47
4.2 Evaluierung des phänotypischen Tests anhand des HBV-Wildtypplasmids	48
4.3 Resistenzprofile der Patientenisolates des HOPE-Projekts	50
4.3.1 Patientenisolates ohne bekannte Resistenzmutationen	51
4.3.2 Patientenisolates mit Lamivudin-Resistenzmutationen	52
4.3.2.1 Isolate mit der Primärmutation rtM204V	53
4.3.2.2 Isolate mit der Primärmutation rtM204I	55
4.3.3 Patientenisolates mit Entecavir-Resistenzmustern	58
4.3.4 Patientenisolates mit Adefovir-Resistenzmutationen	60
4.3.5 Patientenisolates mit besonderen Kombinationen	63
4.4 Evaluierung des Fitnesstests anhand von Patientenisolaten	64
4.5 Charakterisierung der Mutation rtI233V	65
4.6 Untersuchung neuer RT-Inhibitoren	67
4.7 Erstellung stabiler Linien mit dem Vektor pCEP-Puro	70
4.7.1 Erstellung stabiler Linien mit pCEP-Puro-Cherry	71
4.7.2 Erstellung einer stabilen HBV-produzierenden Hepatom-Zelllinie mit Hilfe eines episomalen Expressionskonstrukts	73
4.8 Erstellung eines Überlängenkonstrukts ohne Vektorkassette	74
5. Diskussion	77
5.1 Grundlagen des phänotypischen Resistenzassays	77
5.2 Klonierung der Patientenisolates	79
5.3 Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens	80
5.4 Evaluierung des Tests anhand des HBV-Wildtyps	83
5.5 Berechnungsmodell der IC ₅₀	86
5.6 Klinische Bedeutung der in vitro ermittelten Resistenz- und Fitnesswerte	86
5.7 Auswertung der Daten des HOPE-Projekts	88
5.7.1 Patientenisolates ohne bekannte Resistenzmutationen	88
5.7.2 Isolate mit der Primärmutation rtM204V	89
5.7.3 Isolate mit der Primärmutation rtM204I	92
5.7.4 Patientenisolates mit Entecavir-Resistenzmustern	93
5.7.5 Patientenisolates mit Adefovir-Resistenzmustern	93
5.7.6 Patientenisolates mit kombinierten Primärmutationen	96
5.7.7 Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Daten	96
5.8 Bewertung der klinisch relevanten Nukleos(t)idanaloga	98
5.9 Bedeutung der Mutation rtI233V	98
5.10 Evaluierung der getesteten neuen Inhibitoren	102

5.11 Zelllinien mit stabilen episomalen Expressionsvektoren.....	104
5.12. Erstellung einer stabilen HBV-produzierenden Hepatomzelllinie mit Hilfe eines episomalen Expressionskonstrukts	107
5.13 Vektorkassetten-unabhängige Erstellung eines 1.1fachen Überlängenkonstrukts	108
6. Ausblick.....	111
7. Zusammenfassung	112
8. Summary	113
10. Abkürzungen.....	127
11. Anhang	130
12. Danksagung	134
13. Eidesstattliche Erklärung.....	135

1. Einleitung

1.1 Historische Einführung

Die Gelbsucht begleitet den Menschen als epidemische Erkrankung schon seit dem Altertum. Hippokrates beschreibt bereits im fünften Jahrhundert vor Christus die Verbindung zwischen Ikterus und Lebererkrankung in der Schriftensammlung Corpus Hippocraticum (Papavramidou N. 2007).

Dass es sich dabei meist um eine infektiöse Krankheit handelt, wurde allerdings erst Ende des 19. Jahrhunderts durch Lürmann festgestellt. Er beschrieb 1885 den Ausbruch einer „Ikterusepidemie“ bei Werftarbeitern, die zuvor eine Pockenschutzimpfung erhielten (Lürmann A. 1885). Wahrscheinlich handelte es sich dabei um den ersten dokumentierten Fall eines Hepatitis-B-Ausbruchs.

In den nächsten Jahrzehnten gelang es durch Beobachtungen zwei Formen der Krankheit zu unterscheiden. Zum einen den fäkal-oral übertragenen Typ A, der immer ausheilt und zum anderen den durch Blut oder Serum übertragenen Typ B (Serumhepatitis), der bei circa (ca.) 10% der Betroffenen zu einer chronischen Erkrankung führte.

Trotz weiterer Gelbsuchtepidemien, wie zum Beispiel (z. B.) 1937 nach einer Gelbfieberimpfung von Soldaten (Findlay und MacCallum 1937), konnte der Erreger der Krankheit über lange Zeit nicht identifiziert werden.

Den ersten Hinweis lieferte schließlich 1963 der erst kürzlich verstorbene Mediziner Baruch S. Blumberg. Er beschäftigte sich mit den genetischen Unterschieden menschlicher Serumproteine und entdeckte dabei im Blut eines australischen Ureinwohners ein neues Antigen, das er Australia-Antigen nannte (Blumberg et al. 1965). Es gelang Blumberg schließlich eine Verbindung zwischen dem gehäuften Auftreten des Australia-Antigens und den Krankheiten Leukämie, Down-Syndrom und Hepatitis festzustellen (Blumberg et al. 1967). Die direkte Verbindung zwischen dem Australia-Antigen und dem Serumhepatitis-Antigen wurde schließlich ein Jahr später gezeigt (Prince 1968). Da in den 20 nm großen Partikeln, die vom Australia-Antigen gebildet werden, keine Nukleinsäuren gefunden wurden, war zunächst unklar ob es sich hierbei um eine Viruserkrankung handelte.

Virusartige Partikel wurden 1970 durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von D. S. Dane entdeckt. Er untersuchte Serum von Patienten bei denen eine Australia-Antigen assoziierte Erkrankung vorlag und konnte zeigen, dass neben den 20 nm großen Partikeln auch größere Partikel mit etwa 45 nm vorlagen, die ebenfalls Australia-Antigen auf ihrer Oberfläche enthielten (Dane et al. 1970). Man bezeichnete diese daraufhin als Dane-Partikel.

Nur ein Jahr später gelang J. Almeida die Trennung des inneren Core-Partikels von der Virushülle durch Detergenzbehandlung und der Nachweis des Core-

Antigens, gegen das infizierte Personen ebenfalls Antikörper bildeten (Almeida et al. 1971).

Eine mit den Core-Partikeln assoziierte endogene Polymeraseaktivität konnte 1973 nachgewiesen werden (Kaplan et al. 1973). Schließlich konnte man mit der Entdeckung einer circular doppelsträngigen DNA innerhalb der Dane-Partikel (Robinson und Greenman 1974) die Serumhepatitis endgültig mit einer viralen Infektion in Verbindung bringen.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse bezeichnete man die Dane-Partikel als Hepatitis B Virus (HBV), das Australia Antigen als Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg) und das Core-Antigen als Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg).

1.2 Hepadnaviridae

1.2.1 Eigenschaften

Das humane Hepatitis B Virus gehört zur Familie der *Hepadnaviridae*. Diese Virusfamilie umfasst ausschließlich Vertreter, die sich durch einen ausgeprägten Lebertropismus und eine hohe Wirtsspezifität auszeichnen. Die Mitglieder dieser Familie replizieren ihr DNA-Genom mittels reverser Transkription aus einem mRNA-präGenom (Summers und Mason 1982) und zeigen somit eine phylogenetische Verwandtschaft mit dem Blumenkohlmosaikvirus (*Caulimoviridae*) und den Retroviren (Toh et al. 1983, Miller und Robinson 1986). Vertreter der Familie bilden neben den infektiösen Viruspartikeln auch nicht infektiöse subvirale Partikel (Summers et al. 1978, Mason et al. 1980, Marion et al. 1980) und verursachen während der Replikation keine direkte Zytopathogenität (Chisari und Ferrari 1995).

1.2.2 Taxonomie

Die Familie der *Hepadnaviridae* wird in zwei verschiedene Genera eingeteilt. Die *Avihepadnaviren* infizieren ausschließlich Vögel. Vertreter dieser Gattung sind zum Beispiel das Duck Hepatitis B Virus (Mason et al. 1980), das Snow Goose Hepatitis B Virus (Chang et al. 1999) oder das Heron Hepatitis B Virus (Sprengel et al. 1988).

Die *Orthohepadnaviren* kommen bei Menschen und Altweltaffen wie zum Beispiel dem Schimpansen (Vaudin et al. 1988) oder dem Gorilla (Grethe et al. 2000), aber auch bei Neuweltaffen wie dem Wollaffen (Lanford et al. 1998) vor. Auch bei einigen Nagetieren der Familie *Sciuridae* konnten Vertreter der *Orthohepadnaviren* gefunden werden. Dabei handelt es sich zum Beispiel um das Woodchuck Hepatitis Virus (Summers et al. 1978) oder das Ground Squirrel Hepatitis Virus (Marion et al. 1983).

Das menschliche Hepatitis B Virus lässt sich in 9 verschiedene Genotypen (A bis I) unterteilen, die sich in jeweils mindestens 8% der DNA-Sequenz des

kompletten Genoms unterscheiden (Norder et al. 2004, Yu et al. 2010). Außerdem werden noch Genosubtypen unterschieden, welche eine Divergenz der Nukleotidsequenz von mindestens 4% aufweisen. Die verschiedenen HBV-Genotypen und Subgenotypen zeigen dabei eine unterschiedliche geografische Verteilung (Abbildung 1).

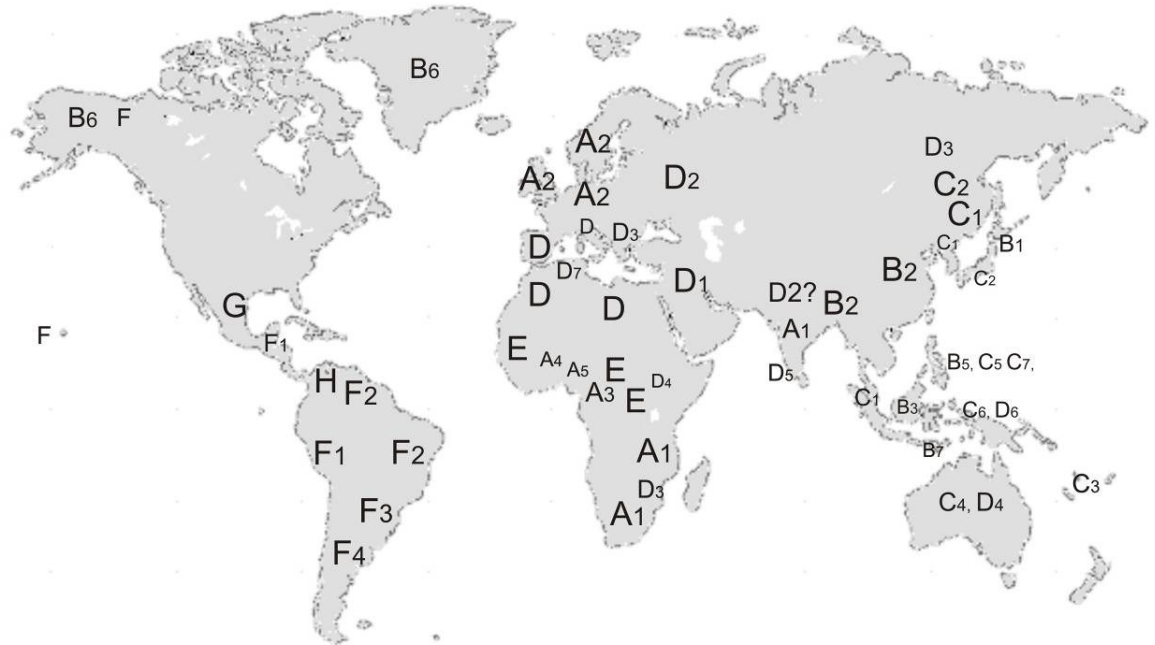


Abbildung 1: Geografische Verteilung der HBV-Genotypen und Subgenotypen:

Dargestellt ist der jeweils am häufigsten in der Region vorkommende HBV-Genotyp bzw. Subgenotyp (nach Schäfer, Glebe und Gerlich, 2010, modifiziert)

Die Hepatitis B Viren der Altweltaffen sind den humanen Genotypen sehr ähnlich und bilden deshalb keine eigene Spezies. Das Hepatitis-Virus des Wollaffen als auch die verschiedenen Vertreter unter den Nagetieren unterscheiden sich jedoch stärker untereinander als auch von den menschlichen Varianten (Abb. 2).

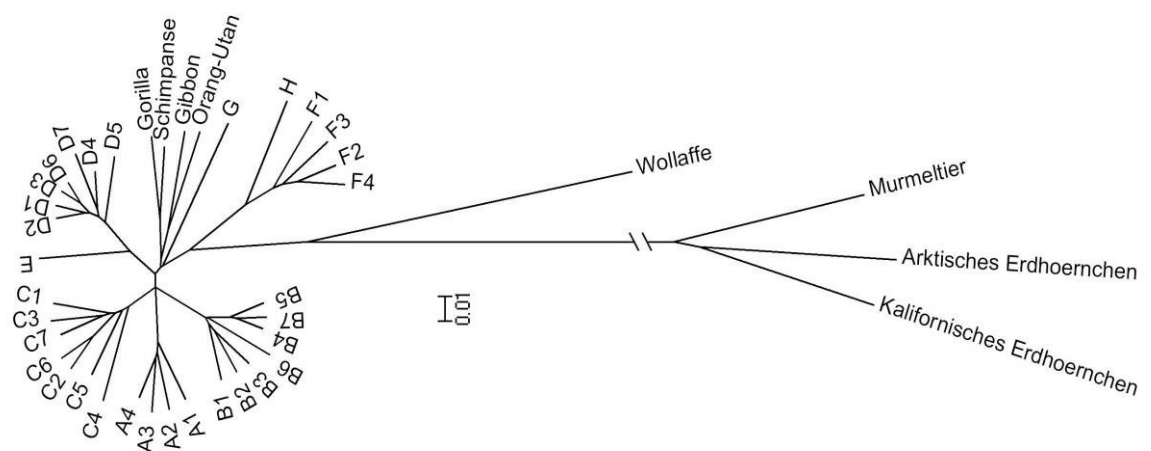


Abbildung 2: Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen Orthohepadnaviren

Als Grundlage des Stammbaums wurden die Nukleotidunterschiede der kompletten Genome analysiert. Die menschlichen Varianten sind mit dem jeweiligen Genotyp bezeichnet (nach Schäfer, Glebe und Gerlich, 2010, modifiziert)

1.3 Epidemiologie und Übertragung

Das Hepatitis B Virus wird parenteral vorwiegend über Blut und teilweise über andere Körperflüssigkeiten übertragen. In Gebieten mit hoher Durchseuchungsrate sowie schlechten medizinischen und hygienischen Bedingungen spielt vor allem die perinatale Übertragung während der Geburt oder die Übertragung im Kleinkindalter eine große Rolle während in Ländern mit besseren Lebensbedingungen die Verbreitung über sexuellen Kontakt die größte Bedeutung hat.

Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind die nosokomiale Infektion durch Bluttransfusion oder invasive Eingriffe mit blutkontaminierten Gerätschaften (z. B. mehrfach benutzte Spritzen, diese insbesondere bei illegalem Drogenmissbrauch). Tätowierungen oder Piercings können ebenfalls zu einer Infektion führen.

Hauptgrund für die Verbreitung der Krankheit sind chronische hoch virämische Virusträger, die 10^9 bis 10^{10} Viruspartikel pro ml Blut besitzen können. Es reichen bereits winzigste Mengen ihres Blutes (1 nl) aus um eine Infektion hervorzurufen (Gerlich und Schäfer 2002).

Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2002) hatte etwa ein Drittel aller Menschen (2 Milliarden) bereits Kontakt mit dem Hepatitis B Virus und ca. 5% der Weltbevölkerung (350 Mio.) sind chronisch infiziert.

Hochendemiegebiete sind dabei vor allem Subsahara-Afrika, Südostasien sowie Ozeanien und weite Teile der ehemaligen Sowjetunion. Es wird davon ausgegangen, dass weltweit ca. 30% aller Fälle von Leberzirrhose und 53% aller Fälle eines hepatozellulären Karzinoms auf die Infektion mit Hepatitis B zurückzuführen sind. Durch diese mit dem Virus assoziierten Folgeerkrankungen sterben jährlich etwa 1 Millionen Menschen (Perz et al. 2006).

In Deutschland sind nur 7% der erwachsenen Bevölkerung (18- 79 Jahre) mit dem Virus in Kontakt gekommen und nur 0,6% zeigen HBsAg als Marker für eine noch laufende Infektion (Epidemiologisches Bulletin, 2010). Damit ist Deutschland bei den Ländern mit niedriger Trägerrate einzuordnen (Thierfelder et al. 2001), was vor allem auf die hohen hygienischen wie gesundheitlichen Standards, sowie eine mittlerweile gute Durchimpfung der Bevölkerung zurückzuführen ist.

1.4 Morphologie

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu den umhüllten Viren. Es besitzt eine Lipidmembran, in die drei virale Oberflächenproteine: L(arge)HBs, M(iddle)HBs und S(mall)HBs eingebettet sind (Abbildung 3).

Aufgrund des gemeinsam genutzten ORFs sind alle Oberflächenproteine Co-Carboxyterminal und unterscheiden sich lediglich in der Länge ihres

aminoterminalen Endes. Dabei ist das MHBs ein um die PräS2-Domäne (55 Aminosäuren) verlängertes SHBs (226 Aminosäuren) und das LHBs ein um die PräS1-Domäne (109 bis 118 AS) verlängertes MHBs (Heermann et al. 1984).

Die verschiedenen Oberflächenproteine unterscheiden sich außerdem noch in ihrem Glykosylierungsmuster (Schmitt et al. 1999).

Den Hauptanteil der Oberflächenproteine macht sowohl in den subviralen Partikeln als auch im eigentlichen Virus das SHBs aus. Im Viruspartikel, sowie in den filamentösen subviralen Partikeln ist der Anteil an LHBs größer als in den sphärischen Partikeln. MHBs ist überall nur in geringen Mengen vorhanden und hat bis jetzt keine eindeutige Funktion (Heermann et al. 1984).

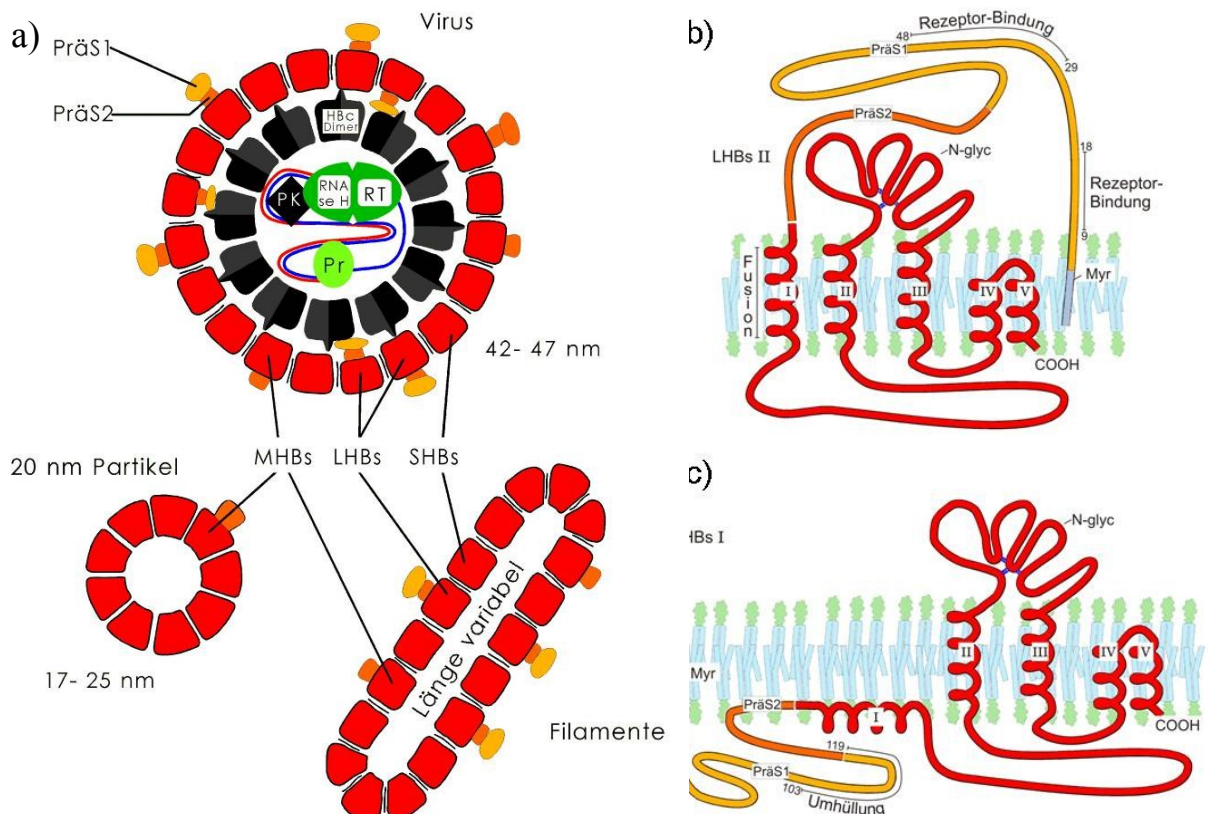


Abbildung 3: Darstellung der Virusmorphologie

a) schematische Darstellung des Viruspartikels und der subviralen Partikel: äußere Hülle aus Oberflächenproteinen bestehend aus: SHBs (rot), PräS2-Domäne (orange) und PräS1-Domäne (gelb), schwarz-grau: Core-Dimere, rot-blaue Linie: partiell doppelsträngige DNA, Pr: Primer-Domäne, RT: reverse Transkriptase-Domäne, RNase H: RNase H-Domäne, PK: Proteinkinase
b) externe und **c)** interne Topologie des LHBs, N-glyc: N-Glycosylierung, Myr: N-terminale Myristoylierung, I bis V: postulierte Transmembrandomänen, die Bereiche für die Umhüllung der Capside beziehungsweise Bindung an den Rezeptor sind gekennzeichnet (nach Schäfer, Glebe und Gerlich, 2010, modifiziert)

Die subviralen Partikel existieren im Patienten im Vergleich zum infektiösen Virus meist in einem deutlichen Überschuss um den Faktor 1000 bis 10000.

Das LHBs kann im Viruspartikel zwei unterschiedliche Topologien einnehmen, die beide zu etwa 50% vorliegen (Abbildung 3 b und c). Die interne Topologie, bei der die PräS-Domäne nach innen gerichtet ist, dient der Interaktion

zwischen Core-Partikel und Virushülle. Bei der externen Topologie ist die PräS-Domäne nach außen gerichtet und dient der Bindung an den spezifischen Rezeptor (Bruss et al. 1994, Lambert und Prange 2001).

Das eigentliche Viruspartikel zeigt in der Elektronenmikroskopie bei Negativkontrastierung einen Durchmesser von 42 bis 47 nm (Dane 1970), während die subviralen sphärischen Partikel einen Durchmesser von 17 bis 25 nm aufweisen und die filamentösen Partikel den gleichen Durchmesser bei variabler Länge zeigen (Robinson 1977).

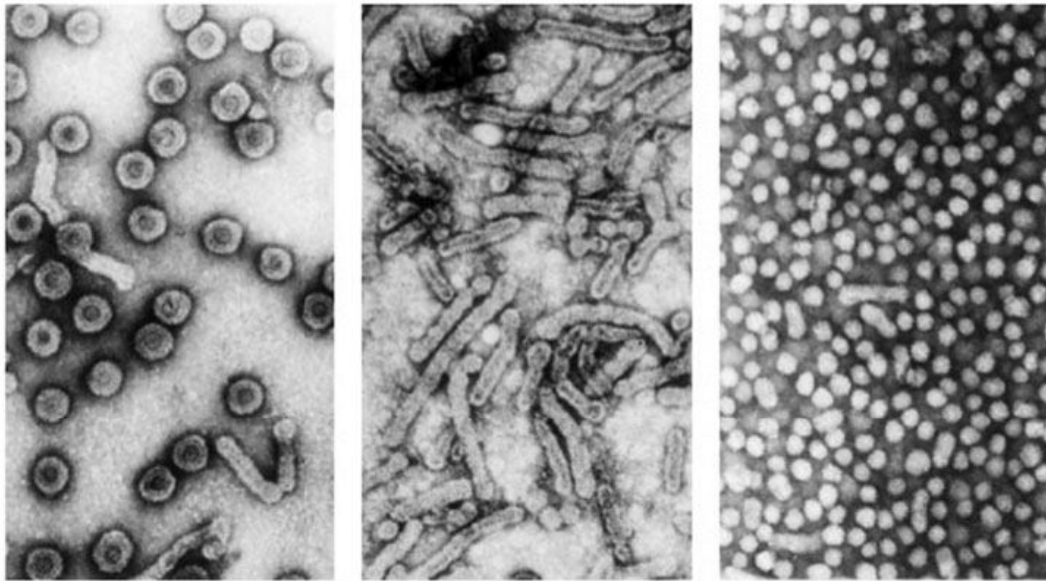


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Viruspartikel (links), filamentösen subviralen Partikel (Mitte) und sphärischen subviralen Partikel (rechts), Negativkontrastierung (Kann und Gerlich 2005, modifiziert)

Im Inneren des Virus befindet sich das aus 180 oder 240 Core-Protein-Untereinheiten bestehende Capsid. Die Untereinheiten können sich spontan und ohne Mithilfe anderer zellulärer oder viraler Proteine zu einem Capsid mit T3 oder T4 Symmetrie zusammenlagern (Crowther et al. 1994, Dryden et al. 2006, Seitz et al. 2007).

Für dieses Self-Assembly sind vor allem die 145 aminoterminalen Aminosäuren des Core-Proteins verantwortlich, während das basische carboxyterminale Ende für die RNA-Bindung wichtig ist (Nassal 1992).

Die partiell doppelsträngige DNA ist kovalent mit der viralen Polymerase verbunden (Gerlich and Robinson 1980) und in das 34 nm große Kapsid verpackt (Almeida et al. 1971, Robinson 1974, Summers et al. 1975). Im Kapsid befinden sich außerdem noch zelluläre Chaperone, sowie eine Proteinkinase (Albin und Robinson 1980, Gerlich et al. 1982, Bartenschlager und Schaller, 1992; Hu et al., 1997, Wittkop et al. 2010).

Die virale Polymerase ist ein Polyprotein, das aus vier Domänen besteht: dem Terminalen Protein, dem Spacer, der reversen Transkriptase und der RNase H. (Bartenschlager und Schaller 1988, Radziwill et al. 1990, Beck und Nassal 2007).

1.5 Genomstruktur

Die im Viruspartikel vorliegende Form des Genoms ist partiell doppelsträngige DNA, da die Sekretion des Virus noch vor Vollendung der Plusstrangsynthese erfolgt (Hruska et al. 1977; Landers et al. 1977). Dadurch ist der nicht codierende Plusstrang am 3'-Ende in seiner Länge variabel. Das 5'-Ende des Plusstranges ist festgelegt und beginnt mit einem 18 bp langen RNA-Fragment mit einer Cap-Struktur (Seeger et al., 1986). Der codierende Minusstrang des Genoms ist hingegen vollständig und besitzt am 3'-Ende sogar eine kurze terminale Redundanz von etwa 10 Basenpaaren. An das 5'-Ende des Stranges ist das Terminale Protein des Polymerasekomplexes kovalent gebunden (Bartenschlager et al. 1988). Da die viralen DNA-Stränge unterschiedliche 5'- und 3'-Enden aufweisen, wird die Zirkularität durch die Paarung beider Stränge erreicht, wodurch zusätzlich ein kurzer dreifach vorliegender DNA-Abschnitt entsteht (Sattler und Robinson 1979, Will et al. 1987).

Das HBV-Genom ist mit seinen etwa 3200 Basenpaaren (genotypabhängig) eines der kleinsten bisher bekannten Virusgenome (Summers et al. 1975). Der Minusstrang enthält insgesamt vier ORFs, die vollständig oder teilweise überlappen (Tiollais et al., 1985) und für die viralen Proteine codieren: 1. die Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs, die durch unterschiedliche Startcodons des S-ORFs gebildet werden, 2. HBcAg das als Grundbaustein des Kapsids dient und vom C-ORF codiert wird 3. HBeAg welches immunmodulatorische Funktion hat und eine sekretierte Form des HBcAg darstellt (wird durch ein vorgelagertes Startcodon des C-ORFs translatiert) 4. das Polymeraseprotein, welches durch den P-ORF codiert wird und 5. das X-Protein, das durch den X-ORF codiert wird und dessen Funktion noch nicht genau bekannt ist.

Die ORFs werden durch mindestens vier Promotoren, sowie zwei Enhancer (Tang et al. 2001) als auch das Glucocorticoid responsive Element (GRE) und das negativ regulierende Element (NRE) kontrolliert.

An GRE und NRE binden leber- und differenzierungsabhängige Faktoren, die zu einer hepatozytenspezifischen Transkription und Replikation führen.

Die verschiedenen gebildeten mRNAs besitzen das gleiche 3'-Ende, da sie alle das einzige virale Polyadenylierungssignal verwenden (Ganem und Varmus, 1987). Neben den Elementen auf DNA-Ebene besitzen auch die mRNAs verschiedene cis-Elemente. Das hochkonservierte encapsidation signal (ϵ) (Laskus et al., 1994) ist für die Erkennung des Prä-Genoms durch die virale Polymerase und die anschließende Enkapsidierung verantwortlich (Bartenschlager et al., 1990; Hirsch et al., 1990), wobei der Abstand des Elements vom 5'-Ende der mRNA eine entscheidende Rolle für dessen Funktionalität spielt (Ryu et al. 2010). Weitere cis-Elemente sind die direct repeats (DR1 und DR2) und die Sequenzelemente ϵ II, ω and ϕ , die alle für die Genomreifung von Bedeutung sind, sowie das posttranslatorische

regulatorische Element, welches das Splicing der mRNAs verhindert und den Transport in das Cytoplasma verstärkt (Huang und Liang 1993).

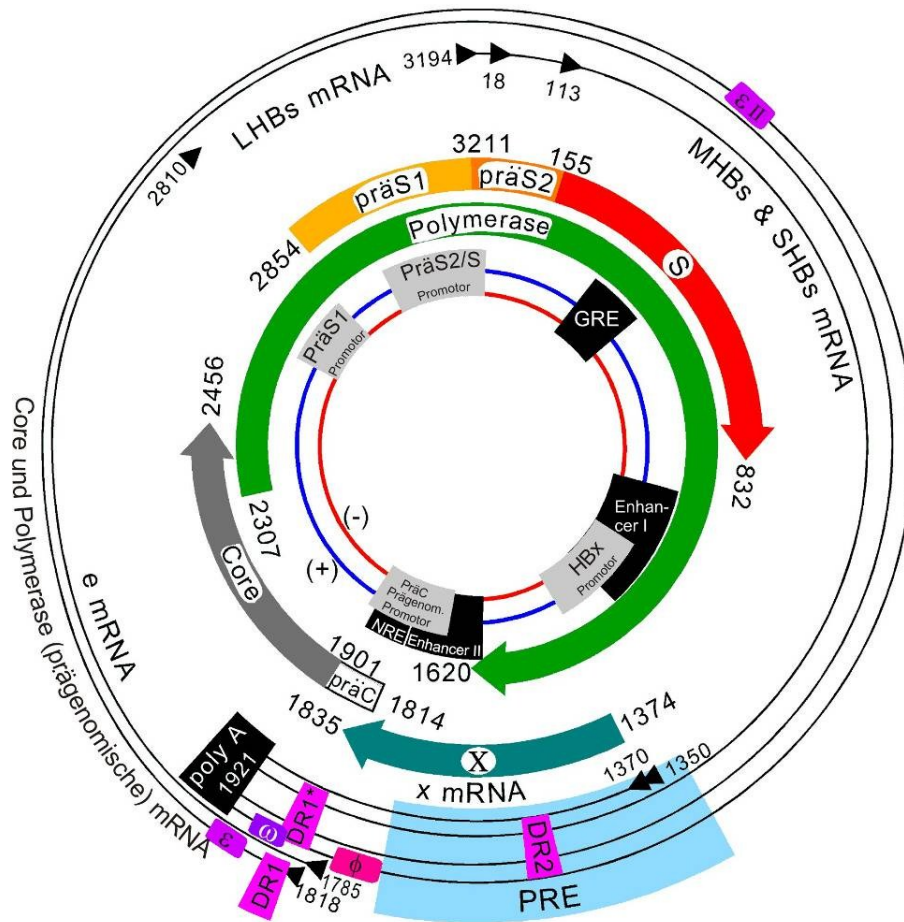


Abbildung 5: Überblick über die Genomstruktur des HBV

Die Zahlen geben die Basenpositionen ab der EcoRI Schnittstelle im Genom von HBV-Genotyp A2 (AJ012207) an. Innen sind die vier ORFs der HBV-cccDNA dargestellt: S-ORF (rot) mit PrS1- (gelb), PrS2-Domäne (orange), Pol-ORF (grün), X-ORF (türkis), C-ORF (grau) mit präC-Bereich für HBeAg (weiß) mit den entsprechenden Promotoren (grau), GRE und NRE (schwarz). Außen sind die verschiedenen mRNAs dargestellt mit dem PRE in blau, sowie den verschiedenen für die Replikation und Genomreifung wichtigen cis-Elementen in lila und der Polyadenylierungsstelle in schwarz (nach Schäfer, Glebe und Gerlich 2010, modifiziert)

1.6 Viraler Replikationszyklus

HBV bindet initial mit niedriger Affinität an Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche (Schulze et al., 2007; Leistner et al., 2008). Nachfolgend wird über die PrS1-Domäne des extern vorliegenden LHBS und dessen N-terminal angehängte Myristinsäure die Bindung an den hochaffinen noch nicht bekannten spezifischen Rezeptor vermittelt. (Le Seyec 1999, Glebe et al. 2003, Engelke et al. 2006, Glebe und Urban 2007). Der anschließende Mechanismus der Aufnahme des Virus in die Leberzelle ist nicht geklärt. Man weiß allerdings, dass ein bestimmter Bereich des SHBs für die Infektion von Bedeutung ist.

Dieser Bereich induziert wahrscheinlich die Fusion der Virusmembran mit einer zellulären Membran (Jaoude and Sureau 2005).

Das Entenhepatitisvirus (DHBV) wird über Endocytose aufgenommen und benötigt dabei keinen sauren pH um das Kapsid freizusetzen (Köck et al. 1996). Für das humane HBV lässt sich ein ähnlicher Mechanismus annehmen.

Nach der noch nicht vollständig geklärten Aufnahme des Virus wird das Kapsid anschließend mittels Mikrotubuli aktiv zum Kern transportiert (Rabe et al. 2006). Der carboxyterminale Teil der HBcAg-Proteine enthält ein Kernlokalisationssignal (NLS), welches die Bindung des Kapsids an die Kernporen über den Importin α/β Weg vermittelt (Kann et al. 1999). Nachdem das Kapsid den nukleären Basket erreicht hat, destabilisiert es sich und entlässt das HBV-Genom in das Innere des Kerns (Rabe et al. 2003).

Die partiell doppelsträngige nicht kovalent geschlossene HBV-DNA wird mittels zellulärer DNA-Polymerase und anderer zellulärer Reparaturmechanismen anschließend in die replikative kovalent geschlossene zirkuläre Form (cccDNA) umgewandelt (Köck und Schlicht 1993). Diese cccDNA assoziiert anschließend mit Histonen und liegt als eine minichromosomähnliche Struktur episomal vor (Bock et al. 1994). Durch die zelluläre RNA-Polymerase II werden anschließend die viralen mRNAs transkribiert (Rall et al. 1983). Die ca. 3,3 kb lange prägenomische mRNA (pgmRNA) dient nicht nur als Template für die Translation von HBcAg und viraler Polymerase sondern auch als Matrize für die Replikation des viralen Genoms. Die virale Polymerase erkennt die Sekundärstruktur des ε -Signals der pgmRNA und bindet zusammen mit zellulären Chaperonen an dessen bulge Region. Dies führt zur Unterdrückung der Translation und zur Verpackung des Komplexes mit HBcAg zu einem unreifen Kapsid (Junker-Niepmann 1990; Bartenschlager und Schaller 1992; Seifer et al. 1993; Hu and Seeger 1996, Ryu et al. 2010). Die Bildung der partiell doppelsträngigen Virus DNA aus der pgmRNA findet innerhalb des Kapsids statt (Summers und Mason, 1982).

Die reverse Transkription beginnt an der Sekundärstruktur des ε -Signals (Wang und Seeger 1992 und 1993). Die Hydroxylgruppe des Tyrosins 63 (Tyrosin 93 bei DHBV) des terminalen Proteins simuliert hierbei das 3'-Ende einer Nukleinsäure (Weber et al., 1994; Zoulim und Seeger, 1994, Lanford et al. 1997). An dieses Ende werden mittels reverser Transkription 3 bis 4 DNA-Basen angehängt, welche anschließend zu dem am 3'-Ende liegenden DR1 verschoben werden (erster Matrizensprung, Abbildung 6a). Dies ist wahrscheinlich durch die zirkuläre Form der pg mRNA möglich, welche durch zelluläre Faktoren hervorgerufen wird. Am 3'-Ende dienen die Nukleotide als Primer für die komplette reverse Transkription des Minusstranges. Dies erklärt warum später im Viruspartikel die Polymerase kovalent mit dem Minusstrang verbunden ist. (Wang und Seeger, 1992). Während der reversen Transkription findet gleichzeitig der Abbau der prägenomischen mRNA durch die RNase H-Domäne statt. Es bleiben allerdings 18 Basen RNA am 5'-Ende übrig die

aufgrund sterischer Hinderung nicht von der RNase-Domäne abgebaut werden können. Dieses kurze RNA-Stück springt nun zum DR2 (zweiter Matrizensprung, Abbildung 6b) und initiiert die Plusstrangsynthese, die durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der viralen Polymerase durchgeführt wird (Lien et al. 1986, Seeger und Maragos 1989). Da der DR1 im Minusstrang aufgrund der terminalen Redundanz an beiden Enden vorhanden ist, kann die Polymerase die Lücke des vorzirkularisierten Genoms überspringen und die Synthese am 3'-terminal gelegenen Ende des Minusstranges fortsetzen (dritter Matrizensprung, Abbildung 6c).

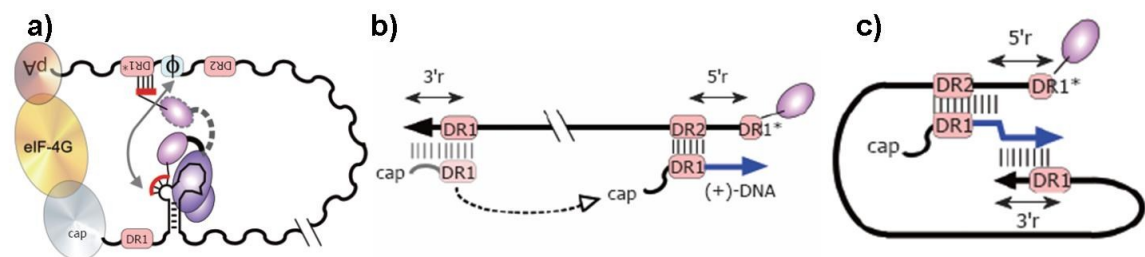


Abbildung 6: Schritte der Replikation des HBV-Genoms

a) Postulierte Zirkularisierung der pgmRNA über zelluläre Faktoren (eIF-4G: Elongationsinitiationsfaktor 4G, pA: Poly-A-Schwanz, cap: Cap-Struktur) und der erste Matrizensprung (rot: 3 bis 4 Basen DNA am terminalen Protein (lila)) **b)** zweiter Matrizensprung des 18 Basen langen RNA-Stücks nach der reversen Transkription **c)** dritter Matrizensprung vom 5'-terminalen DR1 zum 3'-terminalen DR1 und Zirkularisierung während der Plusstrangsynthese (modifiziert nach Beck und Nassal 2007)

Die Plusstrangsynthese wird vorzeitig beendet, weshalb der Plusstrang eine variable Länge besitzt (Kaplan et al. 1976, Hruska et al. 1977, Landers et al. 1977).

Zusammen mit der Genomreifung werden die C-terminalen Enden des HBcAg phosphoryliert, was zur Exposition des NLS führt. Die nun reifen Core-Partikel können deshalb neben der Umhüllung durch virale Oberflächenproteine auch über Mikrotubuli zurück zum Kern transportiert werden. Diese Rezirkulation erhöht den intranukleären Pool an cccDNA. (Tuttleman et al. 1986, Sells et al. 1988, Wu et al. 1990) und führt zur Persistenz des Virus in episomaler Form. Die Reifung des Kapsids erhöht außerdem dessen Affinität zum LHBs. Wenn genügend Oberflächenproteine (LHBs durch die 2,4 kb mRNA, MHBs und SHBs durch die 2,1 kb mRNA) translatiert wurden, wird ein Großteil der reifen Kapside umhüllt und über Multivesicular Bodies aus der Zelle transportiert (Lambert et al. 2007). Die subviralen Partikel, welche ebenfalls durch die Oberflächenproteine gebildet werden, sekretieren über den Golgi-Apparat. Neben den strukturbildenden Proteinen werden auch das X-Protein (durch die 0,7 kb mRNA) und das HBeAg (durch die 3,35 kb mRNA) synthetisiert. Diese Proteine sind jedoch nicht direkt an der Replikation beteiligt.

Müdigkeit und Ikterus (Gelbfärbung von Augen und Haut). Besonders typisch ist die deutliche Erhöhung der Alanin-Aminotransaminase(ALT)-Werte. Ist die akute Verlaufsform besonders stark, spricht man von einer fulminanten Hepatitis. Mit unter 1% der akuten Verläufe ist sie sehr selten, weist unbehandelt jedoch eine Lethalität von 70% auf und führt innerhalb von Tagen zu schwersten Symptomen. Die akute Hepatitis heilt in etwa 90% der Fälle aus und führt zur Immunität. In etwa 10% der Fälle geht sie in eine chronische Verlaufsform über, die bei Immuntoleranz auch aus einem inapparenten Verlauf hervorgehen kann. Bei Neugeborenen entwickeln jedoch bis zu 90% eine chronische Hepatitis (Ganem and Prince 2004). Die chronische Verlaufsform ist definiert durch den Nachweis von HBsAg im Blut über mindestens sechs Monate. Während der chronischen Hepatitis B kann eine HBeAg-Serokonversion auftreten. Sie wird assoziiert mit einer deutlichen Verringerung der Virusreplikation und meistens einem besseren Krankheitsverlauf (Niederau et al. 1996).

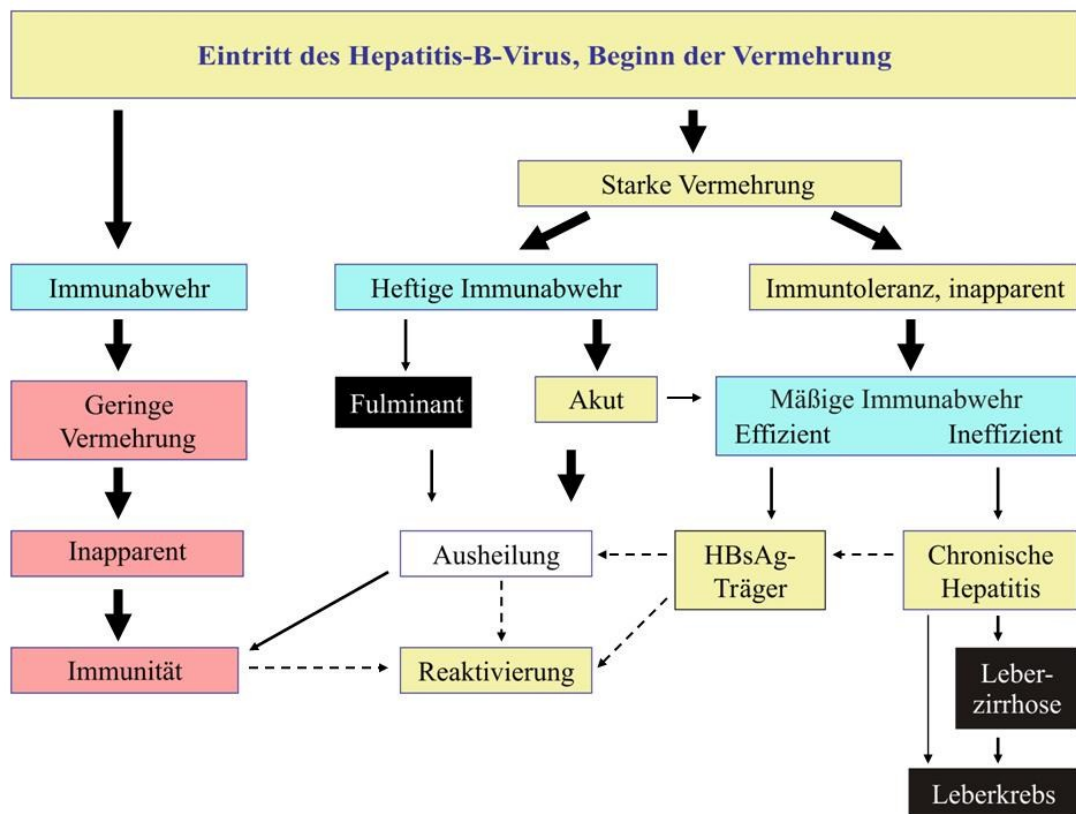


Abbildung 8. Verlaufsformen der HBV-Infektion
(nach Schäfer, Glebe und Gerlich 2010, modifiziert)

1.8 Therapie

Bei einer akuten Hepatitis B Erkrankung besteht normalerweise kein Behandlungsbedarf, da sie bei Erwachsenen in etwa 9 von 10 Fällen ausheilt und zur Immunität führt. Liegt eine fulminante Hepatitis vor kann die Gabe von reversen Transkriptase-Inhibitoren (RT-Inhibitoren) den Verlauf signifikant

verbessern (Yu et al. 2011). Die häufigste Form der therapiebedürftigen HBV-Erkrankung ist allerdings die chronische Hepatitis B.

Ein chronischer Träger hat deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms. Das Risiko an einer dieser Folgeerkrankungen zu leiden kann um den Faktor 100 bis 200 erhöht sein und ist dabei direkt abhängig von der Viruslast des Patienten (Beasley et al., 1981, Arbuthnot und Kew 2001, Block et al. 2003, Cougot et al. 2005, Chen et al. 2006, Iloeje et al. 2006).

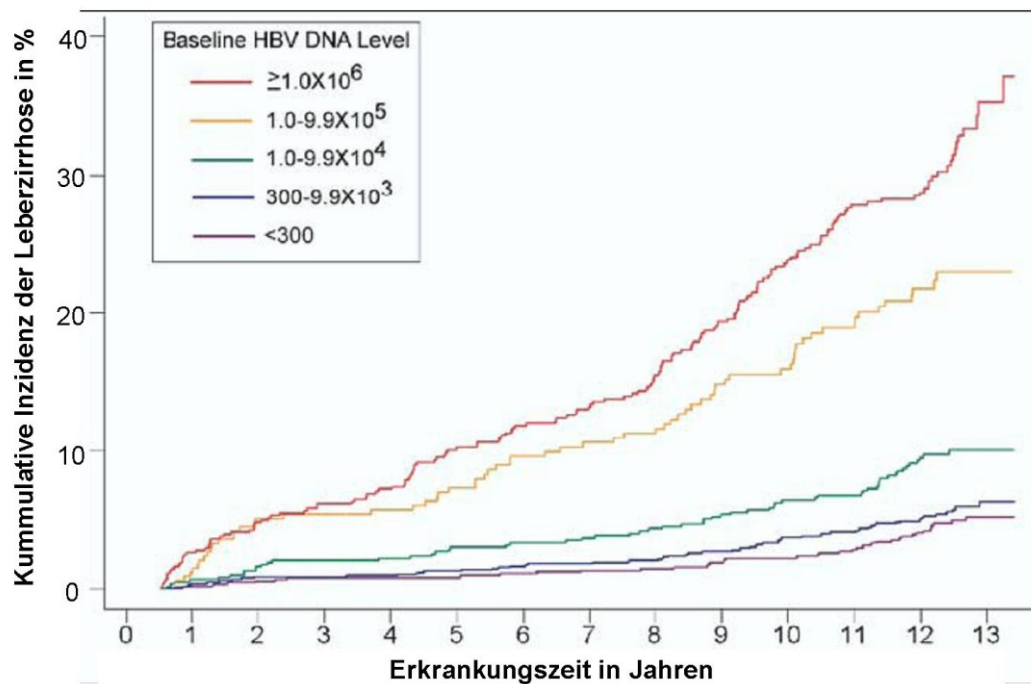


Abbildung 9: Abhängigkeit zwischen Viruslast und Inzidenz der Leberzirrhose

3582 Patienten mit verschiedenen hohen Viruslasten in GE/ml (Box oben links) wurden über einen durchschnittlichen Zeitraum von 11 Jahren beobachtet. (nach Iloeje et al. 2006, modifiziert)

Primäres Ziel jeder Therapie der chronischen Hepatitis B ist deshalb die Verringerung der Viruslast, sowie der ALT-Werte und wenn möglich die Stimulierung des Immunsystems mit anschließender HBeAg-Serokonversion. Eine Therapie wird bei Patienten mit mehr als 10 000 GE/ml und erhöhten ALT-Werten durchgeführt. Bei der Behandlung kommen sowohl Interferon alpha als auch Inhibitoren der reversen Transkriptase zum Einsatz (Cornberg et al. 2011). Interferon alpha ist besonders gut geeignet bei HBeAg-positiven Patienten mit hohen ALT-Werten aber niedriger Viruslast sowie niedrigen HBsAg und HBeAg-Mengen im Blut. Der HBV-Genotyp spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Die Genotypen A und B versprechen wesentlich höhere Behandlungserfolge als die Genotypen C und D, weshalb eine Genotypisierung vor Behandlung empfohlen wird (Perillo 2009). Eine Therapie kann mit herkömmlichem (ca. 6 Monate Behandlungsdauer) oder pegyliertem (48 Wochen Behandlungsdauer) Interferon alpha erfolgen und dient dazu das Immunsystem des Patienten zu stimulieren, sowie die Virusreife zu hemmen, um die Infektion dauerhaft

kontrollieren zu können. Bei etwa 40% der Patienten kann eine HBeAg-Serokonversion, sowie eine deutliche Reduzierung des Virustiters erzielt werden (Perrillo et al. 1990, Wong et al. 1993). Bei einem kleineren Anteil kommt es sogar zur völligen Unterdrückung der Virämie und einer HBsAg-Serokonversion. Die Interferonbehandlung führt jedoch zu schweren Nebenwirkungen. Dazu zählen zum Beispiel: grippeähnliche Symptome, Depressionen, Leukopenie und Haarverlust (Perrillo 2009). Aus diesem Grund sollte die Therapie nur bei ausgesuchten Patienten eingesetzt und bei ausreichendem Ansprechen fortgesetzt werden. Die Beobachtung des HBsAg-Levels ist eine gute Möglichkeit den anhaltenden Erfolg einer Interferon-alpha-Therapie frühzeitig zu erkennen (Moucari 2009, Brunetto 2009).

Für Patienten, die keine günstigen Ausgangsbedingungen für eine Interferon-alpha Therapie aufweisen oder bei denen die Therapie keinen Behandlungserfolg gebracht hat, bleibt nur die Behandlung mit Inhibitoren der reversen Transkriptase (Nukleos(t)idanaloga). Mindestens 60% der behandlungsbedürftigen Patienten können dieser Kategorie zugeordnet werden. Nukleos(t)idanaloga werden als inaktive Vorstufe (Prodrug) oral eingenommen und in den Körperzellen zu den aktiven Wirkstoffen phosphoryliert. Die so entstandenen Stoffe konkurrieren mit dem natürlichen Substrat der viralen reversen Transkriptase, den Nukleotidtriphosphaten (dNTPs), und führen beim Einbau in den Minusstrang zum Kettenabbruch. Dies verhindert die effiziente Replikation des Virus, hat jedoch keinen Einfluss auf zelluläre Polymerasen, weshalb es nur selten zu Nebenwirkungen kommt. Der bereits vorhandene Pool an cccDNA in den infizierten Zellen wird durch die Behandlung nicht beeinflusst und kann zu einer sehr schnellen Reaktivierung der Virusreplikation führen, wenn das jeweilige Mittel nicht regelmäßig eingenommen wird. In der Regel führt diese Form der Behandlung nicht zur Heilung oder zur Kontrolle des Virus durch das Immunsystem und muss lebenslang erfolgen.

Derzeit existieren vier klinisch besonders relevante antivirale Substanzen aus der Wirkstoffklasse der Nukleos(t)idanaloga zur Behandlung der chronischen Hepatitis B. Es handelt sich dabei um Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir.

Als erster Inhibitor wurde Lamivudin im Jahre 1999 in Deutschland zur Behandlung von HBV zugelassen und stellte sich als gute Alternative zur Behandlung mit Interferon alpha heraus. Es handelt sich dabei um ein L-Nukleosidanalogen des natürlichen Nukleosids Cytidin, bei dem das 3'-C-Atom der Ribose durch ein Schwefelatom ersetzt wurde (Abbildung 10). Dadurch wird keine Hydroxylgruppe mehr für die Kettenverlängerung bereitgestellt (Ghany und Liang 2007). Es wurde ursprünglich für die HIV-Therapie entwickelt, zeigt jedoch ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit gegen die reverse Transkriptase von HBV.

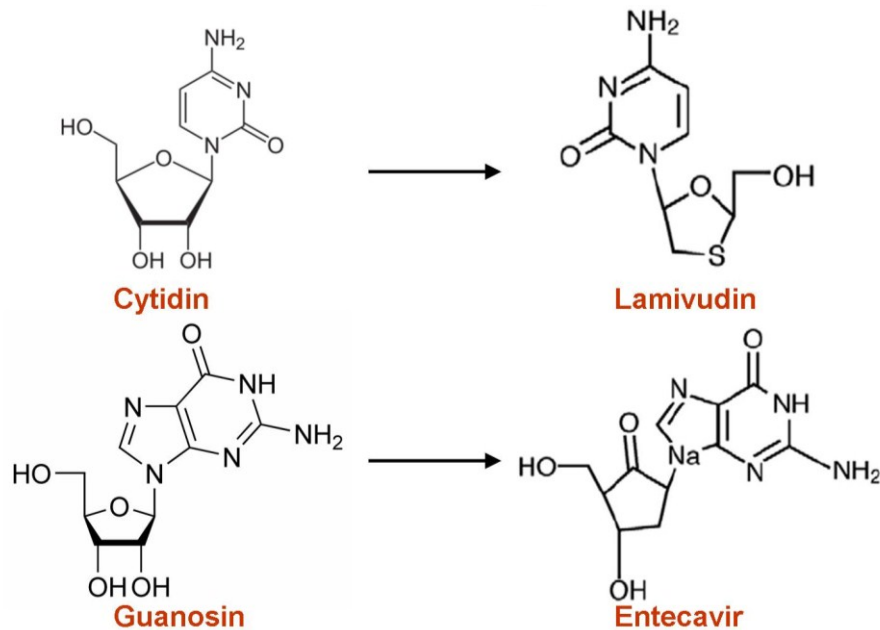


Abbildung 10: Strukturformeln der klinisch relevanten Nukleosidanaloga

Dargestellt sind die jeweils natürlich vorkommenden Nukleoside und die daraus abgewandelten Analoga. (modifiziert nach Ghany und Liang 2007)

Im Jahre 2003 wurde Adefovir, welches ebenfalls aus der HIV-Forschung hervorgegangen ist, als Alternative zu Lamivudin in Deutschland für die Behandlung zugelassen und bei lamivudin-resistenten HBV-Varianten empfohlen. Es handelt sich um ein azyklisches Phosphonat (Abbildung 11) welches als Nukleotidanalogen des Adenosins wirkt (DeClercq et al. 2005). Es stellte sich jedoch als suboptimale Behandlungsalternative heraus, da es nicht bei allen Patienten die gewünschte Wirkung entfaltet und schon in geringen Mengen nephrotoxisch ist.

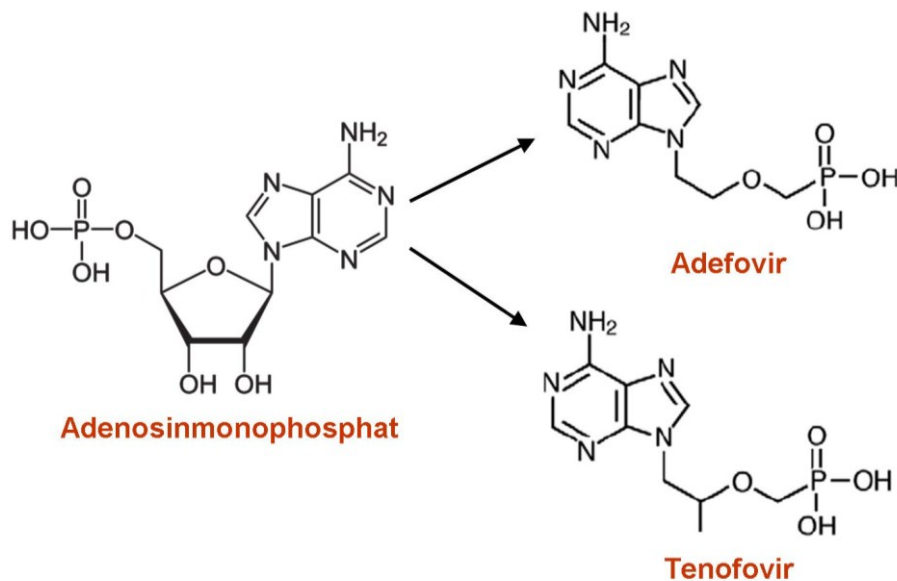


Abbildung 11: Strukturformeln der klinisch relevanten Nukleotidanaloga

Dargestellt sind das natürlich vorkommende Nukleotide und die daraus abgewandelten Analoga. (modifiziert nach Ghany und Liang 2007)

Mit Entecavir wurde 2006 schließlich ein sehr potentes Mittel zur Bekämpfung der HBV-Infektion zugelassen. Dieses Cyclopentan (Abbildung 10) ist ein Nukleosidanalogon des Guanosins und wurde ursprünglich für die Herpestherapie entwickelt. Die benötigte Dosis ist etwa um den Faktor 100 geringer als bei Lamivudin (Ghany und Liang 2007).

Das letzte für HBV zugelassene klinisch relevante Mittel ist Tenofovir. Es stellt eine leicht modifizierte Form des Adefovir mit einer zusätzlichen Methylgruppe dar (Abbildung 11). Dadurch ist es weniger nephrotoxisch als Adefovir und kann mit etwa 30fach höherer Konzentration bei Patienten eingesetzt werden (Reynaud et al. 2009). Es ist derzeit das optimale Mittel unter den RT-Inhibitoren.

1.9 Resistenzentwicklung

Die Entwicklung resistenter Virusvarianten stellt ein großes Problem in der Therapie mit Nukleo(s)tidanaloga dar. Bei der Behandlung mit Lamivudin tragen bereits nach einem Jahr 23% und nach 5 Jahren bis zu 80% der Patienten resistente Varianten. Nach der Zulassung von Adefovir wurden die entsprechenden Patienten umgestellt, doch bis zu 20% sprachen von Beginn an nicht auf die Therapie an und auch bei Patienten, die zuvor kein anderes Mittel bekamen, wurde nach 5 Jahren bei 29% eine Resistenz festgestellt. Entecavir zeigt mit 0,2% nach einem Jahr und 1,2 % nach 5 Jahren deutlich niedrigere Resistenzraten. Dies gilt allerdings nur für zuvor unbehandelte Patienten. In der Gruppe der Patienten, die aufgrund von Lamivudin-Resistenz umgestellt wurden waren nach 5 Jahren bereits 57% resistent gegen Entecavir. Tenofovir ist das einzige Mittel bei dem bis jetzt noch keine Resistenzentwicklung bekannt ist. Es wurde jedoch erst Mitte 2008 für die HBV-Therapie zugelassen, weshalb die Langzeitbeobachtung noch nicht abgeschlossen ist (Zoulim und Locarnini 2009).

Mehrere Faktoren begünstigen die rapide Anpassung des Virus. Da weder die DNA-abhängige RNA-Polymerase II der Zelle, noch die virale reverse Transkriptase ein proof-reading aufweisen, wird mindestens 1 Fehler pro 100 000 Basen eingebaut (Girones und Miller 1989). Die HBV-Infektion zeichnet sich zudem durch sehr hohe Virustiter aus. In einem hoch virämischen Träger werden täglich über 10^{13} neue Viren produziert (Ribeiro und Perelson 2002). Zusammen mit der genannten Mutationsrate und der gegebenen Größe des Genoms von etwa 3 kB würde theoretisch jede Base des viralen Genoms täglich 1000 bis 10 000 mal mutiert werden können. Aufgrund dieses Umstandes liegt im Patienten immer eine Mischung aus verschiedenen Virusvarianten vor, die auch als Quasispezies bezeichnet wird. Das Hepatitis B Virus ist damit mindestens genauso variabel wie HIV oder andere RNA-Viren. Die verschiedenen Virusvarianten bleiben zusätzlich lange als persistente cccDNA-Form im Patienten in bestehen. Sowohl die cccDNA als auch die mit ihr

infizierten Leberzellen haben eine lange Halbwertszeit (Seeger und Mason 2000, Lewin et al. 2001) und dienen somit als „Gedächtnis“ für Mutationen. Ein weiterer ungünstiger Faktor ist, dass meist eine einzige Mutation in einer der katalytischen Subdomänen der reversen Transkriptase für eine relevante Resistenzentwicklung ausreichend ist. Steht die Viruspopulation dann unter einem Selektionsdruck in Form eines Inhibitors, kommt es zur Resistenzentwicklung. Dabei setzt sich eine Virusvariante durch, die unter der entsprechenden Inhibitorkonzentration die höchste Fitness (in Form von Resistenz und Replikationsfähigkeit) aufweist. Anschließend kann es innerhalb der neuen Quasispezies noch zu Sekundärmutationen kommen, die die Fitness des Virus weiter erhöhen.

Für die Resistenz gegen die klinisch relevanten Inhibitoren sind bereits verschiedene spezifische Aminosäureaustausche der katalytischen Subdomänen bekannt (Abbildung 12).

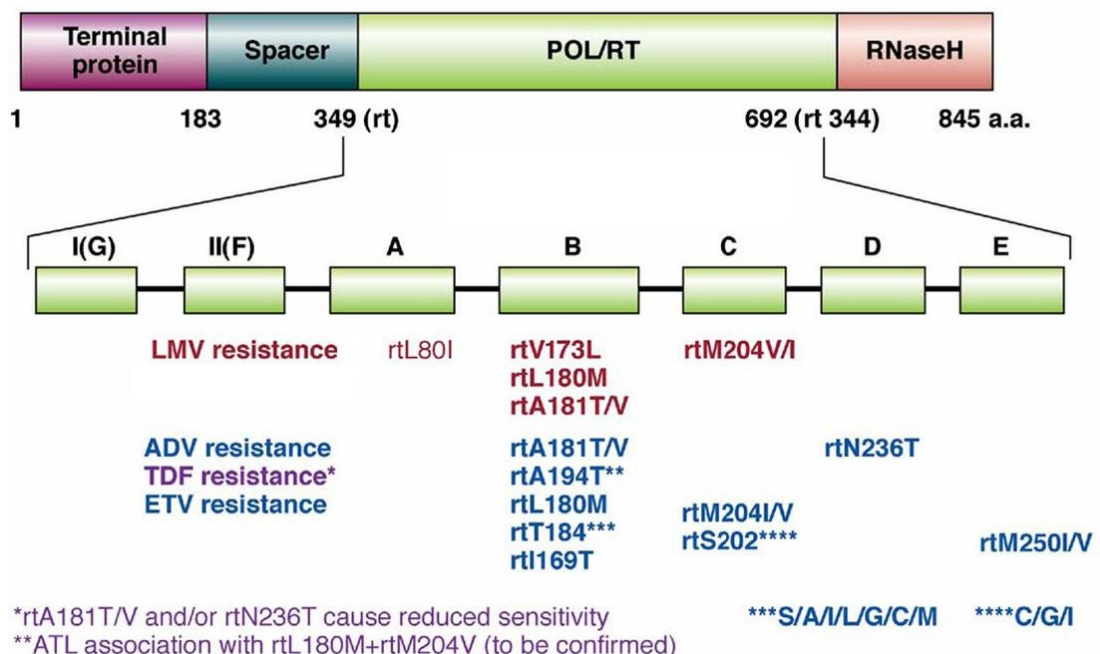


Abbildung 12: Wichtige bekannte Resistenzmutationen des HBV-RT-Bereichs

Im oberen Bereich ist der gesamte Polymerase-ORF mit den einzelnen Domänen dargestellt. In der Mitte ist vergrößert der schematische RT-Bereich mit den katalytischen Subdomänen (A bis F) dargestellt. Darunter sind an der jeweils entsprechenden Position die wichtigsten bekannten Resistenzmutationen der RT aufgelistet. (nach Zoulim und Locarnini 2009, modifiziert)

Erhöht sich die Viruslast im Patienten unter Therapie um mindestens Faktor 10, so spricht man vom Virologic Breakthrough, dem einige Zeit später ein deutlicher Anstieg der ALT-Werte folgt (Biochemical Breakthrough). Da die Inhibitoren die letzte Behandlungsmöglichkeit für den Patienten darstellen, sollte eine Resistenzentwicklung unter allen Umständen vermieden werden. Eine optimale Therapie sollte deshalb ein ständiges Monitoring, sowie eine gutes Vorhersagemodel für Resistenzen beinhalten.

1.10 Resistenz-Testsysteme

Um den Patienten eine optimale Behandlung zur Verfügung stellen zu können und die Resistenzentwicklung so gering wie möglich zu halten, müssen die zur Verfügung stehenden Medikamente optimal genutzt werden können. Dies setzt ein profundes Wissen über die Zusammenhänge der Resistenzen, sowohl im Gesamtbild als auch in Bezug auf den einzelnen Patienten, voraus.

Eine Möglichkeit resistente Viren in einem Patienten nachzuweisen und zu charakterisieren ist der genotypische Ansatz. Hierbei wird dem Patienten Blut entnommen, um die Virus-DNA isolieren und den relevanten Genombereich analysieren zu können. Auf diese Weise können Mutationen festgestellt werden, die bereits zuvor mit bestimmten Resistenzen assoziiert werden konnten. Auf Grundlage des so erhaltenen Wissens lassen sich grobe Vorhersagen über den Phänotyp der entsprechenden Virusvariante treffen.

Ein großer Nachteil des Ansatzes ist allerdings, dass nur bereits bekannte Mutationen beurteilt werden können und die Aussage über die Resistenz nur relativ unsichere und keine quantitativen Angaben zulässt (Durantel 2005).

Neben der Analyse des Virusgenoms gibt es die Möglichkeit einzelne Virusmutanten durch phänotypische Assays in vitro zu charakterisieren. Dabei wird eine replikationsfähige Form des zu testenden Virusgenoms in humane Hepatomzelllinien (z. B. HuH7, HepG2) eingebracht und anschließend die Replikation des Virus analysiert und mit einem Wildtyp verglichen um Fitness, die Konzentration bei der das Virus in seiner Replikation um 50 % gehemmt wird (IC_{50}) und Resistenzfaktoren bestimmen zu können (Durantel 2005).

Die verschiedenen entwickelten Assays unterscheiden sich dabei sowohl in der Form des Virusgenoms als auch der Methode die DNA in die Zellen zu bringen und der Detektion der neu produzierten Virusgenome.

Neben dem zirkularisierten Genom ohne Vektor (Günther 1995) wurden auch Vektorsysteme mit 2fach Überlängenkonstrukten und 1.3fach Überlängenkonstrukten (mit dem natürlichen HBV-Promoter) oder 1.1fach Überlängenkonstrukte (mit einem heterologen Promoter) eingesetzt (Durantel 2005).

Für das Einbringen der HBV-DNA in die Zellen wurden sowohl Baculoviren (Delaney und Isom 1998) als auch Adenoviren (Sprinzl et al. 2001) verwendet. Die verbreitetste Variante ist allerdings die Transfektion bestimmter aus einem Patienten isolierter Mutanten, die zuvor in einen Vektor kloniert wurden (Yang et al. 2004, Langley et al. 2007, Villet et al. 2007). Beim Nachweis der Replikation hat sich die wesentlich genauere Methode der Real-Time PCR (Durantel 2005) gegenüber dem Southern Blot (Allen et al. 1998, Seignères et al. 2002) durchgesetzt.

Die Möglichkeit Zellen sowohl stabil als auch transient zu transfizieren ermöglicht die Anwendung dieser beiden Methoden für unterschiedliche Fragestellungen. Eine stabile Transfektion erlaubt es eine bestimmte

Virusmutante sehr genau zu untersuchen und große Mengen des Genoms bzw. der Virusproteine herzustellen (Ladner et al. 1997, Fu et al. 2000, Yang et al. 2005, Qi et al. 2007), während die transiente Methode schneller und effizienter ist und eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Transfektionen gewährleistet (Durantel 2010).

1.11 Ziele der Arbeit

Bisher gibt es kein einheitliches und effektives System zur Phänotypisierung resistenter HBV-Mutanten. Die einzelnen Testsysteme wurden jeweils nur auf einige wenige Varianten angewendet und sind nur bedingt miteinander vergleichbar. In dieser Arbeit soll innerhalb des HOPE-Kooperationsprojekts, ein schnelles, vergleichbares und effizientes Hochdurchsatzverfahren zur Phänotypisierung großer Mengen an Patientenisolaten etabliert und angewendet werden. Hierfür sollte ein einfaches und kostengünstiges 96-Well-Zellkultursystem entwickelt werden. Auf Grundlage dieses Systems sollte ein unkompliziertes und einheitliches Protokoll zur Klonierung, Kultivierung und Transfektion geschaffen werden, sowie eine sensitive Möglichkeit die neu produzierten Virusgenome zu detektieren und quantifizieren. Die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Systems sollte anhand des Wildtyps ermittelt werden. Anschließend sollten große Mengen an Patientenisolaten charakterisiert werden um ein genaueres Bild der relevanten Mutationen zu erhalten.

Die so generierten phänotypischen Daten sollen dem HOPE-Projekt zur Erstellung eines auf dem Genotyp beruhenden computergestützten Vorhersagemodells zur Verfügung gestellt werden.

Nähere Informationen zu Mitgliedern, Zielen und Organisation des Verbundprojekts: Validierung eines Assays zur Bestimmung von HBV-Resistenzentwicklungen (HOPE) sind der Homepage des Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) zu entnehmen (<http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de>).

Langfristig soll das entwickelte Resistenztestsystem außerhalb des Verbundprojekts ebenfalls für die Charakterisierung neuer Inhibitoren und die Überprüfung bereits postulierter Resistenzmutationen dienen.

Zusätzlich sollte eine Möglichkeit gefunden werden komplette Virusgenome unabhängig von den bisher verwendeten Hilfsvektoren (z. B. pCH9-3091) aus dem Patienten direkt in replikationsfähiger Form, zu klonieren. Der dabei verwendete Vektor soll sowohl eine transiente Transfektion als auch eine schnelle und einfache stabile Transfektion gewährleisten.

2. Material

2.1. Geräte

Bakterienschüttler	INFORS AG, Bottmingen, CH
Brutschrank	SteriCult 200 LABOTECT, Göttingen
Centrifuge 5415C	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5417R	EPPENDORF, Hamburg
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Roth, Karlsruhe
Elisa-Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
Freedom Evo 100/4D	Tecan, Crailsheim
KühlThermoMixer	HLC, Bovenden
Laborschüttler Swip KS 10 DIGI	EDMUND BÜHLER, Tübingen
Laminar Flow Sterilbank HB 2448	HERAEUS, Hanau
LightCycler 480 II	ROCHE Diagnostics, Mannheim
LightCycler® PCR Gerät	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mastercycler®	EPPENDORF, Hamburg
Mastercycler® gradient	EPPENDORF, Hamburg
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Wetzlar
Mikroskop mit Imaging-System	Zeiss, Wetzlar/ Olympus SIS, Münster
Minishaker MS2	MAGV, Rabenau-Londorf
pH Meter 26	RADIOMETER, Kopenhagen, DK
Photometer Picodrop	Biozym Scientific, Oldendorf
PicoFuge™	STRATAGENE, La Jolla, USA
Pipettierhilfen	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Reinstwasseranlage	MILLIPORE, Eschborn
Spannungsquelle Modell 200	GIBCO BRL, Life Technologies INC, USA
UV-Transluminator TFX-20M	VILBER-LOURMAT, Torcy, FR
Vortexer	IKA Janke&Kunkel, Staufen
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach
Zentrifuge CR422	JOUAN, Unterhachingen

2.2. Verbrauchsmaterial

Bakterienschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Deepwellplatte 2,2 ml 96-Well	Thermo Fisher, Schwerte
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegskalpelle	MAGV, Rabenau-Londorf
Glasbehälter (Messzylinder, Bechergläser etc.)	SCHOTT, Mainz
Konduktive Filterspitzen für Freedom Evo	Starlab, Ahrensburg
LightCycler 96-Well Platte	ROCHE Diagnostics, Mannheim
LightCycler® Kapillaren	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mikrotiterplatten MaxiSorb	NUNC, Wiesbaden
PCR-Platten 96-Well	Thermo Fisher, Schwerte
PCR-Tubes 0,2 ml	nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
Pipetten	GILSON, Limburg-Offheim

Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	nerbe plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml für Freedom Evo	Neolab, Heidelberg
Reaktionsgefäße FALCON 15ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Röhrchen 12 ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen 8 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Rundbodenplatten 96-Well	Thermo Fisher, Schwerte
Zellkulturschalen 6 well, 12 well, 10 cm, 96-Well	BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Pufferkomponenten, Medienzusätze

Adefovir	Sequoia, Pangbourne UK (SRP02644a)
Agarose	SEAKEM BIOZYM, Oldendorf (840004)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (2007081)
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA (0140-01)
Bacto-Hefe Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg (288620)
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg (211705)
Bicarbonat	Sigma, Taufkirchen (S5761)
CaCl ₂ x2H ₂ O	Sigma, Taufkirchen (C7902)
Diethanolamin	Sigma Taufkirchen (31590)
DMEM ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe (21063)
DMEM (Pulvermedium)	Invitrogen, Karlsruhe (52100)
DNA-Marker 1 Kb	Invitrogen, Karlsruhe (15615-016)
dNTP Mix (10mM)	Thermo Fisher, Schwerte (R0192)
Entecavir	Sequoia, Pangbourne UK (SRP010887e)
Ethanol 70% vergällt	Fischar, Saarbrücken (27660)
Ethanol pur	J.T.Baker (8228.2500)
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg (21238.01)
FKS	PAA, Pasching, Österreich (A15-101)
FuGene HD	Promega, Mannheim (E2311/2)
FuGene HD	Roche, Mannheim (04709713001)
Gel Auftragspuffer, blau (6X)	New England Biolabs (B7021S)
GeneJuice Transfektionsreagenz	MERCK, Darmstadt (70967)
Glycerol	MERCK, Darmstadt (1040940500)
Isopropanol	MERCK, Darmstadt (1070222511)
JetPrime	PEQLAB, Erlangen (13-114-01)
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt (137039)
Kollagen Typ I	Becton Dickinson, Heidelberg (354236)
Lamivudin	Sequoia, Pangbourne UK (SRP01125I)
L-Homoarginine	Sigma Taufkirchen (53460)
L-Hy2'Fd4C	PD Dr. Eckart Matthes
L-Hy2'Fd4FC	PD Dr. Eckart Matthes
L-Hyd4C	PD Dr. Eckart Matthes
L-Hyd4FC	PD Dr. Eckart Matthes
MES	Roth, (4256.2)

Metafectene	Biontex, Martinsried (T020)
Methylenblau	Roth, (A514.1)
MgCl ₂ Lösung (1 M)	Sigma Taufkirchen (M1028)
MnCl ₂ x4H ₂ O	Sigma, Taufkirchen (63535)
MOPS	Roth, (6979.2)
para-Nitrophenylphosphat	Roth, (4165.1)
PCR-Wasser	Applchem, Darmstadt (A7398)
Penicillin/Streptomycin-Lsg.	PAA, Pasching (P11-010)
Puromycin	Roth, Karlsruhe (0240.4)
Pyruvat	PAA, Pasching (S11-003)
RbCl	Sigma, Taufkirchen (83979)
Tenofovir	Sequoia, Pangbourne UK (SRP01194t)

Wenn nicht hier aufgelistet stammen die Chemikalien jeweils von Roth, Karlsruhe.

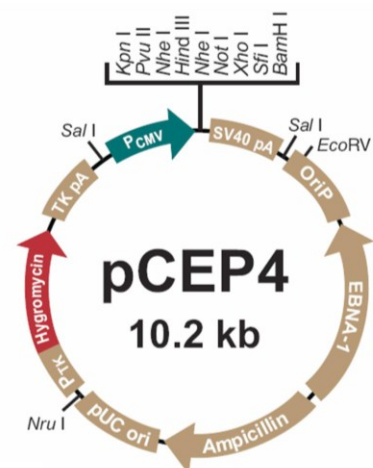
2.4 Enzyme und Kits

Cpol	Thermo Fisher (ER0741)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche (11858874001)
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech (639643)
InviMag® Virus DNA Mini Kit	Invitex (1440200350)
Kpn21	Thermo Fisher (ER0531)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher (F530s)
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen (12943)
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen (11304)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (27104)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (28704)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (28104)
QPCR Capillary Mix	AB-1283/B
QPCR SYBR Green Capillary Mix	AB-1285/B
Sal I HF	New England Biolabs (R3138)
Shrimp Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher (EF0511)
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher (EL0011)
Trypsin/EDTA (5fach)	PAA (L11-003)

2.5 Plasmide und Primer

pCep4 (Invitrogen V044-50)

Es handelt sich um ein eukaryotisches Expressionsplasmid mit CMV-Promoter und SV40 PolyA-Site. Neben den prokaryotischen Elementen pUC-Ori und Ampicillin-Resistenz, besitzt es ein Resistenzgen gegen Hygromycin B, sowie den EBNA-1-ORF und den OriP des Epstein-Barr-Virus.



pCep-Puro (selbst erstellt)

Bei diesem auf pCEP4 basierenden Plasmid wurde das Gen für die Hygromycin-Resistenz durch das Gen für die Puromycinresistenz ausgetauscht. Das Puromycin-Resistenzgen wurde vom Vektor pPur (631601 Clontech) erhalten. Der Vektor pPur wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Michael Kracht zur Verfügung gestellt.

pCep-Puro-Cherry (selbst erstellt)

Dies ist der pCep-Puro-Vektor mit dem Fluoreszenzprotein-ORF von mCherry (aus dem Plasmid pczmCherry) in die Multiple cloning site (MCS) einkloniert.

pCep-Puro-3091 (selbst erstellt)

Dies ist der pCep-Puro-Vektor mit dem 1.1fachen HBV-Überlängenkonstrukt aus dem Vektor pCH9-3091 in die MCS eingebaut.

pCep-Puro-ID309 (selbst erstellt)

Dies ist der pCep-Puro-Vektor mit einem 1.1fach Überlängenkonstrukt aus dem Patientenserum ID309 in die MCS eingebaut.

pczmCherry

Es handelt sich hierbei um das Plasmid pcDNA3.1+ mit Zeomycin-Resistenz, welches den mCherry-ORF in der MCS enthält. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Dirk Lindemann zur Verfügung gestellt.

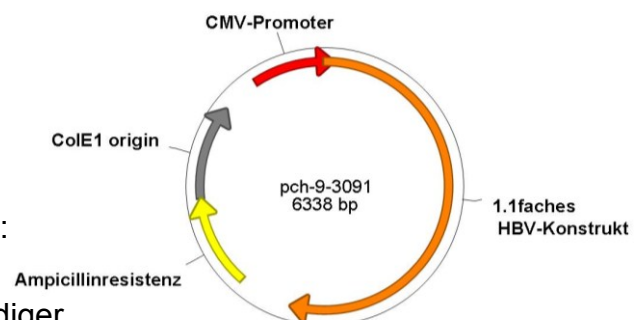
pCH-9-3091

Dieses pBR322-Derivat enthält einen CMV-Promoter und ein nachgeschaltetes 1.1faches Überlängenkonstrukt eines HBV-Genoms

Genotyp D (Serotyp ayw1, GenBankID:

DQ464168.1, Junker-Niepmann et al. 1990). Es führt zur Produktion vollständiger

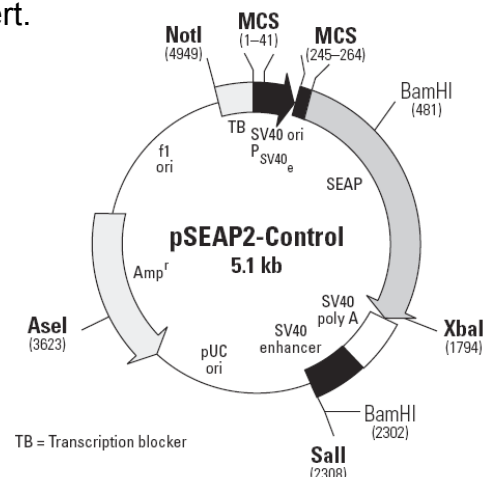
Viren. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer zur Verfügung gestellt. Es dient als Wildtyp und Klonierungskassette aller HBV-Genome des phänotypischen Assays.

**pBB-ID309 (selbst erstellt)**

Vektor mit einem HBV-Genom aus dem Patientenserum ID309 in das Vektorbackbone von pCH9-3091 einkloniert.

pSEAP2-Control (Clontech, 631717)

Dieses Plasmid codiert für eine um den Membrananker trunkierte, sekretierte Form der humanen placentalen alkalischen Phosphatase (SEAP) unter der Kontrolle des SV40-Promoters. Es dient als Transfektionskontrolle.



pBs HBV 991 T7 Dimer

Es handelt sich um den Vektor pBluescript II SK von Fermentas mit einem HBV-Genom-Dimer (HBV Genotyp A2, Gen Bank X51970) in die MCS einkloniert. Das Dimer wurde dem Vektor puc991 entnommen.

pmaxGFP (Amaxa/Lonza, Köln)

Dieses eukaryotische Expressionsplasmid codiert den ORF für das grün fluoreszierende Protein. Es enthält eine Kanamycin-Resistenz.

pCX

Dieses Plasmid ist ein pCDNA3-Derivat mit dem X-ORF eines Genotyp A in die MCS einkloniert (Schuster et al. 2000).

Tabelle 1: Sequenzierprimer:

Name	Sequenz 5'-3'
CMV-fw	cgcaaatgggcggtaggcgtg
SP6	atttaggtgacactatagaa
preS1 sense	gtcaccatattcttggaac
S6 as	ckttgacadactttccaatcaatag
Pol sense	actcctccagcttatagacc
Pol antisense	atatttggtgggcgttcacg
gap reverse	ttttagtatgccctgagcc
gap2 reverse	aatgtttgctccagacctgc
vor SV40 reverse	atgtctggatccggccttgc

Die Primer wurden entweder direkt bei GATC synthetisiert oder von MWG synthetisiert und für die Sequenzierung mitgeschickt.

Tabelle 2: Primer für Klonierungen

Name	Sequenz
11-A fw	ataagcagagctcgtcgacgcacatgcaactttttcacc
11-N-rev	ccgcagacacatccagc
11-D-fw	tggatgtgtctgcggc
11-I-rev	agcaagcttgctagcgaaggaaagaagtcagaaggc
3091-30nt fw	ataagcagagctcgtcgacg
3091-30nt rev	agcaagcttgctagccgactcactatagggctagcg
Cepu mcs fw	ctgctagcaagcttgctagc
Cepu mcs rev	cagcttctagagatctgacgg
Cepu-30nt fw	gctagcaagcttgctagcgg
Cepu-30nt-rev	acgagctctgcttatatagacctcc
cherry fw	gatctctagaagctgcctacgtctcatcagcatgg
cherry rev	caagcttgctagcagccactgtgctggatatctgc

Cloning-BB-Will-fw	accatgcaacttttgaagagctcaagcttcgctagccctatagtgagtcg
Cloning-BB-Will-rev	ggcagaggtgaaaaagaagagctcaagcttctgcttatatagacctcccacc
Infu-pceppur-fw	gctattggccattgcatacg
Infu-pceppur-rev	acccttggcagaacatatcc
Infu-ppur-fw	tgttctgccaaggggttctccttacgcatctgtgc
Infu-ppur-rev	gcaatggccaatagcggaggttagggttatgagg
Pol-Hope-Forward	gtcacttccggagactactgttgtagacgacg
Pol-Hope-Reverse	gcgcatcgggtccggcagatgagaaggc
Will-P1-11-fw	ttcacctctgcctaatacatc
Will-P2-11-rev	aagttgcatggtgctgg
Will1-xs	ttttcacctctgcctaataca
Will2-xs	aaaaagttgcatggtgctgg

Tabelle 3: Primer und Sonden für Real-Time-PCR

Name	Sequenz
X2-sense	gacgtcctttgtytacgtcccgtc
X2-antisense	tgcagagttgaagcgaagtgcaca
X-PCR-Sonde	Fam-ctccccgtctgtgccttctcatctgccg-Tamra
Hope-sense	actaggaggctgtaggcata
Hope-antisense	agactctaaggcttcccg

Tamra = Tetramethylrhodamine, Fam = Carboxyfluorescein, y = C oder T

2.6 Patientenseren und Patientenisolat

Tabelle 4: Patientenseren oder isolierte Virusgenome, HOPE-Projekt

In Klammern sind die in Gießen erstellten Klone aufgezählt, die aus den jeweiligen Seren entstammen und in den phänotypischen Assay eingegangen sind. Alle gezeigten Seren wurden freundlicherweise von Dr. Florian van Bömmel zur Verfügung gestellt.

FvB-147(1,3)	FvB-158(1,2)	FvB-167(7)
FvB-150(1)	FvB-161(4)	FvB-169(2,4)
FvB-153(1)	FvB-162(1)	FvB-170(5)
FvB-154(2,3,9)	FvB-164(1,7)	FvB-172(1,4,5)
FvB-155(1)	FvB-165(2)	FvB-175(9,14)
FvB-157(1)	FvB-166(1,3)	

Tabelle 5: Patientenisolat, HOPE-Projekt

Die aufgelisteten Klone lagen bereits als Plasmid vor und wurden von Maria Neumann-Fraune (Uniklinik Köln) kloniert und zur Verfügung gestellt.

KW-WH2-34	RK-16-3	RK-182-1	RK-24
RK-117-3	RK-16-5	RK-190-1	RK-266-2
RK-16-1	RK-172-2	RK-2-1	RK-44
RK-162-1	RK-172-3	RK-224-5	WH-2-10-1

Sonstige Patientenserum:ID309

Serum aus dem Konsiliarlabor für Hepatitis B mit der internen Identifikationsnummer 309. Dies ist ein Serum eines chronisch infizierten Patienten mit hoher Viruslast und dem Genotyp D. Es dient in aufgereinigter Form als Standard für alle in dieser Arbeit verwendeten quantitativen PCRs und als Template für die Konstruktion eines 1.1fachen Überlängenkonstrukts.

K229, K257, K259

Seren aus dem Konsiliarlabor für Hepatitis B. Es handelt sich um Seren der Patienten 1 (K229), 2 (K259) und 3 (K257) aus dem Artikel: „Variant of Hepatitis B Virus with Primary Resistance to Adefovir“, erschienen im New England Journal of Medicine (Schildgen et al. 2006). Die Seren sind jeweils Abnahmen unter Adefovirtherapie.

2.7 Bakterien und Zellen**Hepatomzelllinien**HepG2

Diese Zelllinie ist 1975 aus dem Hepatoblastombiopsiematerial eines 15-jährigen männlichen Amerikaners (europäischen Ursprungs) entstanden. Diese Zellen zeigen viele verschiedene leberzellspezifische Differenzierungen (Aden et al. 1979).

HuH7

Diese Zelllinie wurde aus einem differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen männlichen Japaners gewonnen (Nakabayashi et al. 1982).

HuH7-München

Diese Zelllinie ist ein Abkömmling der HuH7-Zelllinie, bei dem kein Reimport reifer Core-Partikel in den Zellkern mehr stattfinden soll (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Protzer).

Bakterienstämme

One Shot Mach1™ E. coli

Aus diesen ursprünglich von Invitrogen stammenden Bakterienzellen (C8620-03) werden neue chemisch kompetente Zellen hergestellt und für Standardklonierungen und Transformationen verwendet.

Stellar Competent Cells

Diese chemisch kompetenten E. coli haben eine Transformationseffizienz von $> 5 \times 10^8$ cfu/μg. Sie sind Bestandteil des In-Fusion HD Cloning Kits und wurden für In-Fusion-Klonierungen verwendet.

2.8 Puffer, Lösungen und Medien

PBS:

137 mM	NaCl, pH 7,4
2,7 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

pH auf 7,4 einstellen mit HCl

PBS⁺⁺

100fach Stammlösung PBS⁺⁺ (1,32 g CaCl₂ + 2,133 g MgCl₂ ad 100ml Bidest)
in PBS 1 zu 100 verdünnt

DMEM(10L) zur Kultivierung der Hepatomzelllinien:

DMEM (Pulvermedium) nach Herstellerangaben	
100 ml	Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 x)
37 g	Bicarbonat
100 ml	Pyruvat (100 mM)
1-10%	FKS

mit H₂O auf 10 l auffüllen

DMEM zur Inkubation während des phänotypischen Assays:

10 ml	FKS
5 ml	Pyruvat (100 mM)
5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100x)

mit DMEM ohne Phenolrot auffüllen auf 500 ml

TAE(50fach):

242 g Tris
 57,1 l Eisessig
 in 100 ml EDTA (0,5 M)
 auf pH 8,0 einstellen mit Essigsäure
 1 zu 50 in Bidest verdünnen für Gebrauchslösung

TFB 1 (*Transformation Buffer 1*)

10 mM MES (pH 6,2)
 100 mM RbCl
 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 auf 500 ml mit Bidest auffüllen
 auf pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

TFB 2 (*Transformation Buffer 2*)

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15 % Glycerol (v/v)
 auf 100 ml mit Bidest auffüllen
 auf pH 6,5 mit Kaliumhydroxid einstellen

SEAP-Puffer:

10,51 g Diethanolamin (100%)
 50 µl MgCl₂ (1M Lösung)
 0,089 g L-Homoarginin (MG 224,7)
 mit Bidest auf 50 ml auffüllen

Trypsin/ EDTA-Lösung:

100 ml Trypsin/EDTA (5fach)
 400 ml PBS

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 10 g NaCl
 auf 1 Liter mit Bidest auffüllen autoklavieren

Bacto-Agar mit Ampicillin:

400 ml LB-Medium
 7,5 g Bacto-Agar
 aufkochen, auf 60°C abkühlen lassen, 800 µl Ampicillin (50 µg/ml) zugeben

3. Methoden

3.1 Aufreinigung der Virus-DNA aus Serum

Alle Seren wurden nach Herstellerangaben mit dem High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit von Roche aufgereinigt. Dazu wurden je 50 µl bis 200 µl Serum eingesetzt.

3.2 Klonierung von Patientenisolaten in pCH9-3091

Für die phänotypischen Untersuchungen wurde der Polymerase-ORF des Wildtypplasmids (pCH9-3091) jeweils durch den entsprechenden Polymerase-ORF des Patienten ersetzt.

Amplifizierung des Polymerase-ORFs:

Die aufgereinigten HBV-Genome aus Patientenserne wurde jeweils in folgende PCR eingesetzt:

5µL	10xPuffer (ohne MgCl ₂)
1µL	Pol-Hope-forward (10 pmol/µl)
1µL	Pol-Hope-reverse (10pmol/µl)
1µL	dNTPs (10 mM)
2µL	MgSO ₄ (50mM)
0,25µL	High Fidelity Platinum Taq
35,75µL	H ₂ O
4µL	Virus-DNA

Tabelle 6: Temperaturprofil der PCR:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	1
94°C	40 sec	35
62°C	45 sec	
72°C	3 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	1

Je 3 µl des erhaltenen Amplifikats wurden anschließend mit 7 µl TAE und 2 µl Gel Loading Dye auf ein 1%iges Agarosegel (1g Agarose in 100 ml TAE mit 0,1 µg/ml EtBr) aufgetragen und zusammen mit dem 1 kb DNA Marker (Invitrogen) bei 75 V gefahren. Das Amplifikat wurde damit auf Größe, Qualität und Menge hin überprüft. Anschließend wurde der Rest des Amplifikats mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl eluiert. Das Aufreinigungskit basiert auf Bindung der DNA an eine Silikamembran, dem Waschen mit ethanolhaltigen Puffern und dem Eluieren mit wasserhaltigem Elutionspuffer. Das erhaltene Eluat wurde mit 2µl Kpn21, 2 µl Cpol und 4µl

Tangopuffer versetzt und 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 80°C inaktiviert.

Zeitgleich wurde der Vektor pCH9-3091 vorbereitet. Zu 4 µg Vektor-DNA wurden je 2 ml Cpol, 2 µl Kpn21 und 2 µl Tangopuffer gegeben. Der Ansatz wurde mit Bidest auf 20 µl aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 2,5 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) und 2,5 µl 10fach-SAP-Puffer hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgten 20 min Inkubation bei 80°C.

Sowohl Vektor als auch Amplifikat wurden anschließend mit entsprechender Menge Gel-Loading Dye (6fach) vermischt, auf ein 0,8%iges EtBr-freies Agarosegel aufgetragen und bei 75 V aufgetrennt.

Das Gel wurde 15 min in 0,02%iger Methylenblaulösung (in Bidest) unter schütteln gefärbt und 20 min mit Bidest (mehrfach gewechselt) schüttelnd entfärbt. Die 3,9 kb große Vektorbande (pCH9-3091 Fragment ohne Pol-ORF) und die 2,4 kb große Bande des Amplifikats wurden mit einem Einwegskalpell aus dem Gel geschnitten und jeweils mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl eluiert. Die Konzentrationen der DNAs wurden mit dem Picodrop-Photometer bestimmt. Vektor und Amplifikat wurden dann im molaren Verhältnis 1 zu 3 mit maximaler DNA Menge in 10 µl Gesamtvolumen gemischt. Zu dem Ansatz wurden 2 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl T4-DNA Ligase 10 fach Puffer gegeben und mit Bidest auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Als Kontrollansatz diente eine Ligation, die nur den Vektor enthielt. Die Ansätze wurden je 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 2 µl für eine Transformation von Mach I Zellen verwendet (siehe 3.4). Am nächsten Tag wurden bei erfolgreicher Klonierung (deutlich mehr Klone auf Platte mit Amplifikat als auf Kontrollplatte) je 10 Klone mit einem Zahnstocher gepickt um je 4 ml LB-Medium (mit Ampicillin) für eine Übernachtskultur (37°C schüttelnd) anzuimpfen. Am nächsten Tag wurden die Kulturen für eine Minipräp-DNA-Aufreinigung verwendet (siehe 3.3). Je 1 µg DNA wurde pro Plasmid in einen Kontrollverdau mit Cpol und Kpn21 eingesetzt (wie weiter oben beschrieben verdaut). Anschließend wurden die Verdau mit Gel Loading Dye auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 75 V aufgetrennt. Die positiven Klone (mit Insertbande) wurden an eine Sequenzierfirma zur Sequenzierung mit dem Primer S6 antisense versendet (siehe 3.6).

Analyse der Sequenzen und Auswahl der Klone

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Internetplattform Geno2Pheno analysiert (<http://www.geno2pheno.org>). Auf Grundlage der Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Bastian Beggel (Saarbrücken, Mitarbeiter HOPE-Projekt) interessante Klone herausgesucht. Die Bewertung erfolgte anhand der bestehenden Resistenzen, dem Genotyp, sowie den bereits getesteten Isolaten. Von den ausgewählten Klonen wurden jeweils 2 µl der Minipräpplasmide für eine erneute Transformation eingesetzt. Von der Transformation wurde eine Kolonie gepickt und in 40 ml LB (mit Ampicillin) für eine Übernachtskultur

gegeben (37°C, schüttelnd). Am nächsten Tag wurde von der Übernachtskultur jeweils eine DNA-Aufreinigung mit dem Plasmid Plus Midi Kit durchgeführt (siehe 3.3). Die so erhaltene DNA wurde erneut durch eine Sequenzierfirma mit dem Primer S6as sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen dienten als Grundlage für den Abgleich mit den phänotypischen Daten und enthielten mindestens die Informationen über die Aminosäuren 80 bis 250 der reversen Transkriptase des jeweiligen Isolates.

3.3 Plasmidpräparation

Sowohl die Plasmid Minipräp als auch die Plasmid Midipräp von Qiagen beruhen auf der alkalischen Lyse zur Aufreinigung der DNA. Bei beiden Kits wurde die Aufreinigung nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden 4 ml (Minipräp) bzw 40 ml (Midipräp) Bakterienkultur durch Zentrifugation pelletiert und in einen Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wird ein alkalischer Lysepuffer hinzugefügt. Die Bakterien lösen sich auf und geben DNA, RNA und Proteine frei. Die RNA wird durch die im Resuspensionspuffer vorhandene RNase verdaut und die gefällten Proteine werden mechanisch abgetrennt (Zentrifugation, Filterspritze). Die DNA wird an eine Silikamembran gebunden und mit Waschpuffern gereinigt. Danach wird die DNA eluiert. Bei einer Minipräp liegen 50 µl Eluat mit etwa 300 ng/µl vor. Bei einer Midipräp liegen 200 µl Eluat mit etwa 800 ng/µl vor.

3.4 Transformation

In ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurden je 2 µl des Plasmids oder Klonierungsansatzes überführt. Dazu wurden vorsichtig 45 µl auf Eis stehende chemisch kompetente Mach I- oder Stellar-Bakterienzellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgten ein Hitzeschock im Heizblock bei 42°C für 50 Sekunden und anschließend eine Inkubation auf Eis für 5 min. Zu den Ansätzen wurden dann je 250 µl LB-Medium gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C schüttelnd. Je 20 µl und 200 µl wurden anschließend auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Ein Aliquot vorheriger chemisch kompetenter Mach I wurde zum Animpfen einer 5 ml Übernachtskultur verwendet. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1 zu 10 in LB verdünnt und schüttelnd inkubiert, bis zu einer OD₅₅₀ von 0,45. Die Kultur wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert (CR422). Das Pellet wurde in 16 ml kaltem TFB 1 Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 1,6 ml kaltem TFB 2 aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden 105 µl große Aliquots in 1,5 ml Gefäßen hergestellt und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

3.6 Sequenzierung

Es wurden 30 µl mit 100 ng/µl des entsprechenden Plasmids an die jeweilige Sequenzierfirma geliefert. Falls nötig wurde der Sequenzierprimer dazupipettiert oder mitgeliefert. Die Proben wurden jeweils nach Angaben der Sequenzierfirma verschickt und behandelt. Folgende Sequenzierfirmen wurden in Anspruch genommen:

GATC	Konstanz
SeqLab	Göttingen
LGC Genomics	Berlin

3.7 Klonierungen mit In-Fusion HD Cloning Kit

Der genaue molekulatbiologische Mechanismus dieser Klonierungsmethode wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Das System beruht jedoch wahrscheinlich auf einer modifizierten Form des Ligation Independent Cloning (LIC), bei dem die 3'-5'-Exonukleaseaktivität bestimmter Polymerasen genutzt wird um Überhänge zu erzeugen, die komplementär zueinander sind (Lu 2005). Die Vorteile dieser Klonierungsmethode sind, dass keinerlei Restriktionsenzyme oder Schnittstellen benötigt werden und deshalb keine Beschränkungen bei Klonierungen vorliegen.

3.7.1 Klonierung verschiedener Vektoren

Alle Vektoren und Inserts wurden mittels spezifischer Primer mit der Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase nach folgendem Mastermix und Temperaturprofil amplifiziert:

10 µL	5fach HF-Puffer
1µL	forward Primer (10 pmol/µl)
1µL	reverse Primer (10pmol/µl)
1µL	dNTPs (10 mM)
0,5 µL	Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase
0 bis 2,5 µl	DMSO
5 µL	Plasmid DNA oder Serum DNA (1 bis 10 ng/µl)
mit H2O auf 50 µl aufgefüllt	

Tabelle 7: generelles Temperaturprofil der PCRs:

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	35
56-72°C ¹	30 sec	
72°C	20 sec/kB	
72°C	10 min	1
4°C	∞	1

1: Die Annealingtemperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar angepasst.

Je 3 µl PCR-Produkt wurden zur Evaluierung auf ein 1%iges Agarosegel mit EtBr aufgetragen. Das restliche Volumen wurde anschließend auf ein EtBr-freies 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Methylenblau gefärbt (siehe 3.2). Die Banden mit der jeweils passenden Größe wurden ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt (siehe 3.2). Vektor und Insert wurden anschließend im Verhältnis 1 zu 2 in die In-Fusion Klonierung eingesetzt, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Je Ansatz wurden 2 µl für die Transformation der mitgelieferten chemisch kompetenten Bakterien (Stellar) verwendet (siehe 3.4).

Von den gepickten Klonen wurde jeweils eine Minipräp durchgeführt (siehe 3.3) und die DNA wurde für einen Kontrollverdau mit Sal I eingesetzt. Dabei wurden je 1000 ng Plasmid-DNA mit 2 µl Sal I HF und 2 µl NEB-Puffer 4 gemischt, auf 20 µl mit Bdest aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Der Verdau wurde auf ein 1%iges EtBr-haltiges Agarosegel aufgetragen und bei 75 V gefahren. Es wurden anschließend jeweils Klone mit dem passenden Bandenmuster für eine Plasmid Midipräp verwendet (siehe 3.3).

Bei den Plasmiden mit einem HBV-Genom oder HBV-Überlängenkonstrukt wurde anschließend die komplette Sequenz des Inserts mit den passenden Sequenzierprimern aus Tabelle 1 sequenziert (siehe 3.6 und 2.5).

Tabelle 8: hergestellte Plasmide mit verwendeten Primern und Templates

Plasmid	Template Vektor	Primer Vektor	Template Insert	Primer Insert
pCep-Puro	pCep4	Infu-pceppur-fw und rev	pPur	Infu-ppur-fw und rev
pCep-Puro-Cherry	pCep-Puro	Cepu mcs fw und rev	pczmCherry	Cherry fw und rev
pCep-Puro-3091	pCep-Puro	Cepu-30nt fw und rev	pCH9-3091	3091-30nt fw und rev
pBB-ID309	pCH9-3091	Cloning-BB-Will-fw und rev	ID309 Serum-DNA	Will1-xs und Will2-xs

3.7.2 Erstellung eines 1.1fach-Überlängenkonstrukts

Mit der In-Fusion-Klonierungsmethode ist es möglich mehrere Fragmente innerhalb einer Klonierung gleichzeitig zielgerichtet und nahtlos in einen Vektor einzubauen. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Methode verwendet um aus einem einklonierten HBV-Ganzgenom (1,0fache Länge) mit einer einzigen Klonierung ein replikationsfähiges 1.1faches Überlängenkonstrukt herzustellen.

Hierzu wurde das HBV-Genom des Plasmids pBB-ID309 als Template verwendet. Mit den Primern Will-P1-11-fw und Will-P1-11-rev wurde das Ganzgenom amplifiziert (nach dem in 3.7.1 aufgeführten PCR-Protokoll). Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl eluiert. Zu dem Eluat wurden 4 µl

10fach T4-Ligasepuffer, 4 µl T4-Ligase und 2 µl Bidest geben. Anschließend wurde 1 h bei RT inkubiert. Das ligierte PCR-Produkt wurde 1 zu 100 verdünnt als Template für zwei weitere PCRs eingesetzt, deren Amplifikate zusammen das Überlängenkonstrukt bilden. Für die Vektor-PCR wurde das Plasmid pCep-Puro als Template verwendet. Die PCRs sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Amplifikate wurden anschließend wie in 3.7.1 beschrieben aus einem Methylenblaugel aufgereinigt und in die In-Fusion-Klonierung nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Transformation und der Sal I Kontrollverdau wurden wie in 3.7.1 beschrieben durchgeführt. Die komplette Insert-Sequenz wurde mit den passenden Primern aus Tabelle 1 ermittelt (siehe 3.6 und 2.5).

Tabelle 9: Primer und Templates für die Überlängenklonierung

PCR-Produkt	Template	Primer
pCep-Puro-Vektor-Fragment	pCep-Puro	Cepu-30nt fw und rev
5'-terminale Hälfte Überlängenkonstrukt	ligiertes PCR-Produkt ID309	11-A fw, 11-N-rev
3'-terminale Hälfte Überlängenkonstrukt	ligiertes PCR-Produkt ID309	11-D-fw, 11-I-rev

3.8 Zellkultur

3.8.1 Auftauen von Zellen

Die im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend auf eine 10 cm Zellkulturschale geschüttet, in der bereits 10 ml 10% FKS DMEM vorgelegt war. Nach etwa 4 h Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand durch neues 10% FKS DMEM ersetzt.

3.8.2 Kultivieren von Zellen

Sofern nichts anderes vorgesehen war wurden die Zellen mit 5% bis 10% FKS DMEM im Brutschrank bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂ kultiviert und regelmäßig passagiert um eine Konfluenz von etwa 50% zu halten. Dabei wurden die Zellkulturschalen bei HepG2-Zellen zuvor mit Kollagen Typ I beschichtet, durch Schwenken und anschließendes Abpipettieren einer Kollagenverdünnung mit 2 mg/ml bis 4 mg/ml.

3.8.3 Passagieren der Zellen

Der Überstand der Zellen wurde abgesaugt und etwa 10 ml vorgewärmtes PBS wurde auf die Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wurde das PBS abgesaugt und durch 2 bis 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis sie sich von der Platte lösten. Nach

Resuspension in der Trypsin/EDTA-Lösung wurde der entsprechende Volumenanteil in eine neue 10 cm Schale mit 10 ml 5% bis 10% FKS überführt.

3.8.4 Transfektion der Zellen

Die Zellen wurden am Vortag so passagiert, dass sie kurz vor der Transfektion eine Konfluenz von etwa 80% aufwiesen. Je 8 µg Plasmid DNA (pro 10 cm Platte zu transfizierende Zellen) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 350 µl vorgewärmtem DMEM ohne FKS vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 32 µl FuGene HD Transfektionsreagenz dazugegeben, gründlich gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 10 ml PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend wurden 10 ml 1% FKS DMEM zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch aus DMEM, Plasmid und Transfektionsagenz gleichmäßig auf die Zellkulturplatte getropft. Die Platten wurde geschwenkt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände der Zellkulturschalen durch neues Medium mit 1% bis 10% FKS DMEM mit oder ohne Phenolrot ersetzt.

3.8.4 Selektion der Zellen mit Puromycin

Nach der Transfektion mit einem Puromycin-Resistenzplasmid wurden die Zellen mit DMEM mit 10% FKS und 1 µg/ml bis 3 µg/ml Puromycin kultiviert. Der Überstand wurde in der ersten Woche täglich durch neues puromycinhaltiges Kulturmedium ersetzt. Bei jeder Selektion wurde als Kontrolle eine mit einem Kontrollplasmid (ohne Puromycin-Resistenz) transfizierte Zellkulturschale mitgeführt bis alle Zellen gestorben waren.

3.9 Herstellung der Nukleo(s)tidanaloga Stocklösungen

Von den Nukleo(s)tidanaloga Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir wurden für die phänotypischen Tests innerhalb des HOPE-Projekts je 20 mg abgewogen und mit dem entsprechenden Volumen H₂O für die Molekularbiologie gelöst um folgende Stocklösungen zu erhalten:

Adefovir	2 mM
Entecavir	1 mM
Lamivudin	10 mM
Tenofovir	2,5 mM

Die Stocklösungen wurden anschließend aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die vom HOPE-Projekt unabhängigen phänotypischen Assays wurden eigene Stocklösungen hergestellt.

Die Inhibitoren:

L-Hyd4C (beta-L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-N4-hydroxycytidine)

L-Hyd4FC (beta-L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-N4-hydroxy-5-fluorocytidine)

L-Hy2'Fd4C (beta-L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-N4-hydroxycytidine)

L-Hy2'Fd4FC(beta-L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-N4-hydroxy-5-fluorocytidine)

lagen bereits als 10 mM Lösung in sterilem Wasser vor und wurden bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

3.10 Real Time PCRs

3.10.1 X-PCR

Die X-PCR ist eine quantitative Real-Time PCR, die spezifisch eine Region im X-ORF des HBV-Genoms erkennt. Diese PCR ist sehr sensitiv und hochspezifisch aufgrund der verwendeten Hydrolysis Probe. Die Primer, sowie die Sonde binden in hochkonservierten Bereichen des Genoms und können deshalb einen Großteil aller menschlichen HBV-Varianten detektieren. Diese PCR unterscheidet nicht zwischen der relaxed circular DNA und einem HBV-Genom in einem Plasmid.

PCR-Mix (pro Ansatz):

7 µl QPCR Capillary Mix

1 µl X2 sense (10 pmol/µl)

1 µl X2 antisense (10 pmol/µl)

1 µl X-PCR-Sonde (5 pmol/µl)

+ 10 µl Probe

Die Proben wurden immer mit einem parallel gelaufenen PCR-Standard (aufgereinigtes Serumvirus ID309) absolut quantifiziert. Der Mastermix wurde in die 96-Well-PCR Platte vorpipetiert. Anschließend wurde die jeweilige Probe dazugegeben. Die komplette Platte wurde 2 min bei 700 g zentrifugiert und in das X-PCR-Programm im Light Cycler II eingesetzt.

Tabelle 10: Temperaturprofil des X-PCR-Programms

	Aktivierung	Amplifikation			Kühlung
Anzahl Zyklen	1	45			1
Anfangstemperatur	95°C	95°C	66°C	72°C	40°C
Zeit	15 min	10 sek	20 sek	32 sek	30 sek
Zieltemperatur (-1°C pro Zyklus)			54°C		
Messung	keine	keine	einmalig	keine	keine

3.10.2 HOPE-PCR

Die HOPE-PCR ist eine quantitative Real-Time-PCR, die zwischen Plasmid-DNA und Virusgenom diskriminiert. Die Primer sind so gelegt, dass der Abstand in der relaxed circular Form des HBV nur 400 bp beträgt, während der Abstand der Primer innerhalb eines Plasmids mehrere Kilobasen beträgt (abhängig von der Größe des Plasmids). Aufgrund der genau abgestimmten Elongationszeit der PCR ist die Amplifikation des 400 bp Stücks sehr effektiv, während die Amplifikation des deutlich längeren Fragment um ca. 3 Logstufen schlechter ist. Zur Detektion der DNA wird bei dieser PCR der unspezifische Farbstoff SYBR-Green verwendet.

PCR-Mix (pro Ansatz):

8 µl QPCR SYBR Green Capillary Mix

1 µl Hope sense (10 pmol/µl)

1 µl Hope antisense (10 pmol/µl)

+ 10 µl Probe

Die Proben wurden immer mit einem parallel gelaufenen PCR-Standard (aufgereinigtes Serumvirus ID309) absolut quantifiziert. Der Mastermix wurde in die 96-Well-PCR Platte vorpipetiert. Anschließend wurde die jeweilige Probe dazugegeben. Die komplette Platte wurde 2 min bei 700 g zentrifugiert und in das HOPE-PCR-Programm im Light Cycler II eingesetzt:

Tabelle 11: Temperaturprofil des HOPE-PCR-Programms:

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve		Kühlung
Zyklen	1	45			1		1
Anfangstemperatur	95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	60°C	40°C
Zeit	15 min	15 sek	10 sek	20 sek	10 sek	15 sek	30 sek
Zieltemperatur (+0,1°C pro sek)						95°C	
Messung	keine	keine	einmalig	keine	keine	kontinuierlich	keine

3.11 Phänotypischer Assay

3.11.1 Transfektion und Inkubation der Zellen

Für den phänotypischen Assay wurden HuH7-München Zellen (alle Versuche des HOPE-Projekts) bzw. HuH7-Zellen (alle anderen Versuche) in 5% FKS DMEM auf 10 cm Platten kultiviert. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen so passagiert, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 80% aufwiesen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µg pSEAP2-control und 7 µg des jeweiligen Patientenisolates (in pCH9-3091) transfiziert (siehe 3.8.4). Am folgenden Tag wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS

gewaschen. Anschließend wurden auf jede Platte 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert bis sie sich von der Zellkulturschale lösten. Anschließend wurden sie in der Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert und die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt, welches 20 ml vorgewärmtes 1% FKS DMEM enthielt. Die Falcons wurden bei 60 g für 6 min zentrifugiert (1. Waschschrift). Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 25 ml vorgewärmtes 1% FKS DMEM aufgenommen und erneut bei 60g für 6 min zentrifugiert (2. Waschschrift). Anschließend wurde das Zellpellet erneut in 25 ml 1% FKS DMEM aufgenommen und in ein neues Falcon überführt. Nach der Zentrifugation bei 60 g für 6 min (3. Waschschrift) wurde das Zellpellet in 20 ml 2% FKS DMEM ohne Phenolrot aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 µl auf jedes Well einer vorbereiteten 96 Well Zellkulturschale pipettiert. In der 96 Well Zellkulturschale waren bereits je 100 µl pro Well Inhibitorverdünnung in 2% FKS DMEM ohne Phenolrot nach folgendem Schema vorpipettiert:

	Adefovir			Entecavir			Lamivudin			Tenofovir		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µM			2000 nM			200 µM			200 µM		
B	20 µM			200 nM			20 µM			40 µM		
C	2 µM			20 nM			2 µM			8 µM		
D	0,2 µM			2 nM			0,2 µM			1,6 µM		
E	0,02 µM			0,2 nM			0,02 µM			0,32 µM		
F	kein Inhibitor											

Damit ergaben sich je 3 Verdünnungsreihen mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen je Inhibitor und 12 Kontrollen ohne Inhibitor. Pro Plasmid wurden so 72 Datenpunkte erzeugt. Bei jedem phänotypischen Assay wurde jeweils mindestens ein Wildtyp (pCH9-3091) als Kontrolle und zum Vergleich mitgeführt.

Die Zellen wurden 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden je 50 µl Überstand der Wells der Reihe 1 abgenommen und für den SEAP-Nachweis verwendet. Die restlichen Überstände wurden auf eine 96-Well Rundbodenplatte überführt und bis zur Aufreinigung mit dem Freedom Evo von Tecan bei -20°C gelagert.

3.11.2 SEAP-Nachweis

3.11.2.1 SEAP-Standard und Negativkontrolle

Für die Herstellung des laborinternen SEAP-Standards, wurden 3 Zellkulturschalen (10 cm) mit HuH7-München-Zellen mit je 8µg pSEAP2-control transfiziert (siehe 3.8.4). Anschließend wurden die Zellen 3 Tage mit 10 ml 2% FKS DMEM ohne Phenolrot inkubiert. Die Überstände wurden vereint, gemischt für 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert und aliquotiert.

Zur Herstellung der Negativkontrolle wurde das pSEAP2-control-Plasmid bei der Transfektion durch 8 µg pCEP4 ersetzt (Leervektor).

Bei jedem SEAP-Nachweis wurde der SEAP-Standard parallel in einer 1 zu 2 Verdünnung mit 7 Messpunkten aufgetragen. Der unverdünnte SEAP-Standard wurde mit 400 % Transfektionseffizienz gleichgesetzt (anhand des Verhältnisses zwischen Zellmenge, Volumen, Überstand und Menge transfiziertem Plasmid zwischen 96-Well und 10 cm Schale).

Es wurde ebenfalls je ein Well mit Negativkontrolle bei jedem Assay parallel mitgemessen.

3.11.2.2 Messung des SEAP-Signals

Je 50 µl der Probe (immer 6 Ansätze pro Patientenisolat) wurden auf eine Elisa-Platte pipetiert und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Dazu wurden 100 µl SEAP-Puffer gegeben. Anschließend wurden 50 µl SEAP-Substrat (62 mg para-Nitrophenylphosphat in 5 ml Bideest gelöst) hinzugefügt. Die Messung der OD₄₅₀ im Elisa Reader erfolgte bei einer OD₄₅₀ von 1,0 des höchsten SEAP-Standards.

Der Mittelwert des sechsfach Ansatzes wurde ermittelt und mit dem Signal des SEAP-Standards verglichen. Die so erhaltenen Werte wurden in % Transfektionseffizienz angegeben.

3.11.3 Aufreinigung der Überstände mit Freedom Evo 100/4D

Die DNA aus den erzeugten Zellkulturüberständen wurde in einem automatisierten Verfahren mit dem Pipettierautomaten Freedom Evo 100/4D durchgeführt. Dabei wurde das InviMag® Virus DNA Mini Kit verwendet. Es basiert auf der Bindung der DNA an magnetische Kügelchen, dem Waschen mit Ethanolpuffern und der Elution mit Wasser. Pro Probe wurden je 50 µl in die Aufreinigung eingesetzt und je 100 µl aufgereinigte DNA erhalten.

3.11.4 Quantifizierung der DNA aus den Überständen

Die Quantifizierung der neu produzierten Viren im Überstand erfolgte durch die HOPE-PCR (siehe 3.10.2). Dabei wurden je 10 µl der aufgereinigten DNA (siehe 3.11.3) eingesetzt. Je zwei Standardreihen des aufgereinigten Serums ID309 wurde zur absoluten Quantifizierung mitgeführt.

3.11.5 Auswertung der erhaltenen Daten

IC₅₀:

Von den je 72 erhaltenen Messwerten wurden die Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen (keine Daten aufgrund fehlender Aufreinigung, viel zu hohe Werte aufgrund unspezifischer Amplifikation während der PCR). Aus den 12 Kontrollwerten der nicht inhibierten Wells wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert diente als

Referenz und wurde mit 100% Replikation des Virus gleichgesetzt. Aus den jeweils 3 Ansätzen pro Inhibitorkonzentration wurden ebenfalls die Standardabweichung und der Mittelwert ermittelt. Der Quotient aus dem Mittelwert unter einer bestimmten Inhibitorkonzentration und dem nicht inhibierten Mittelwert, ergab die relative Replikation in %. Durch Logarithmierung der Inhibitorkonzentrationen wurde die nicht lineare Beziehung in eine lineare überführt. Der lineare Bereich wurde mathematisch ermittelt, indem das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsgeraden durch Hinzu- oder Wegnehmen bestimmter Messpunkte optimiert wurde. Für die Regressionsgerade wurden jeweils 3 bis 4 zusammenhängende Messpunkte verwendet. In Ausnahmefällen wurden nur die zwei Messpunkte für die Regressionsgerade verwendet, die in der Nähe der IC_{50} lagen. Anhand der Gleichung der Regressionsgeraden wurde die IC_{50} nach folgender Rechnung ermittelt:

$$IC_{50} \text{ in nM} = (50\% \text{ relative Replikation} - \text{Schnittpunkt mit der Y-Achse}) / \text{Steigung}$$

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse, sowie die Steigung der Regressionsgeraden wurden mittels Excel berechnet.

Replikationsfähigkeit:

Für die Berechnung der Replikationsfähigkeit einer bestimmten Virusvariante wurden die gemessenen Virusmengen auf eine Transfektionseffizienz von 100 % normalisiert und anschließend durch die Virusmengen des ebenfalls normalisierten parallel gelaufenen Wildtyps geteilt. Die Replikationsfähigkeit wurde dann in % Replikation des Wildtyps angegeben.

Resistenzfaktor:

Innerhalb des HOPE-Projekts wurde der Mittelwert der IC_{50} aller Wildtypen ermittelt. Der Resistenzfaktor eines Virus entspricht hier jeweils dem Quotienten aus der IC_{50} der Virusvariante durch die IC_{50} aus dem Wildtypkonsensus.

Bei den phänotypischen Assays, die unabhängig vom HOPE-Projekt durchgeführt wurden, wurde der Resistenzfaktor jeweils durch den Quotienten der IC_{50} der Virusvariante durch die IC_{50} des parallel mitgeführten Wildtyp berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines phänotypischen Assays für HBV

4.1.1 Etablierung des SEAP-Test und des 96-Well Zellkultursystems

Für die Entwicklung eines schnellen und kostengünstigen phänotypischen Assays musste zunächst die Zellkultur auf das kleinstmögliche Format gebracht werden, bei dem noch ausreichend Signale detektiert werden konnten und genügend Zellen überlebten. Außerdem war es notwendig, die Eignung des Plasmids pSEAP2-control als generelles Reporterkonstrukt zur Ermittlung der Transfektionseffizienz festzustellen. Hierzu wurden HuH7-München-Zellen in 10 cm Schalen mit je 8 µg pmaxGFP bzw. pSEAP2-control transfiziert und am nächsten Tag auf unterschiedliche Zellkultur-Formate gesplittet. Nach drei Tagen Inkubation wurde die Expression der beiden Reporterplasmide untersucht.

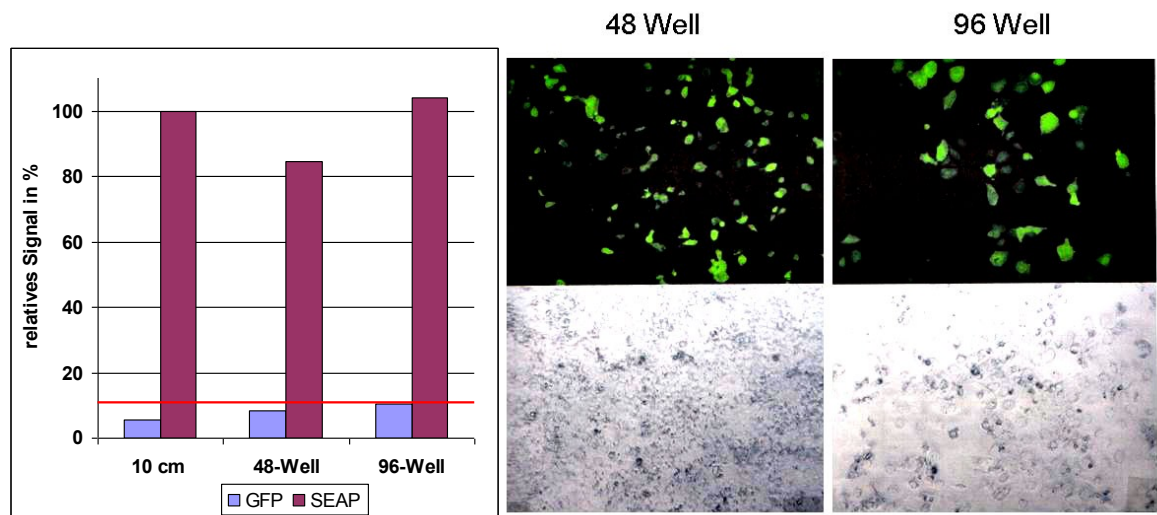


Abbildung 13: Expression der HuH7-München Zellen bei unterschiedlichen Zellkultur-Formaten nach der Transfektion der Reporterkonstrukte

links: SEAP-Signal der Überstände von pSEAP2-control bzw. pmaxGFP transfizierten Zellen bei unterschiedlichen Zellkulturformaten, relativ zur pSEAP2-control transfizierten 10 cm Schale ($OD_{450} = 1,45$), rote Linie: Cut off; rechts: Anteil transfizierter Zellen bei der Transfektion mit pmaxGFP und 2 sek UV-Belichtung, sowie lichtmikroskopische Aufnahmen der gleichen Abschnitte, Anzahl der leuchtenden Zellen ausgezählt

Die Expression des Reporterplasmids pSEAP2-control war bei allen Zellkulturformaten in etwa gleich stark und ausreichend um Transfektionseffizienzen zu vergleichen (Abbildung 13 links). Nach drei Tagen Inkubation war die überwiegende Mehrheit der Zellen sowohl im 48-Well Format als auch im 96-Well Format noch lebendig (Abbildung 13 rechts). Bei etwa der Hälfte der Zellen konnte unabhängig vom Zellkulturformat eine Expression des GFP nachgewiesen werden.

Um mit dem pSEAP2-control Plasmid die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, musste nachgewiesen werden, ob die Menge an SEAP im Überstand in einer linearen Beziehung zur Menge des transfizierten Plasmids steht. Dazu

wurden 10 cm Platten mit HuH7-München Zellen mit unterschiedlichen Mengen pSEAP2-control transfiziert und nach 3 Tagen Inkubation die Menge an SEAP im Überstand festgestellt. Abbildung 14 zeigt, dass die Stärke des SEAP-Signals linear abhängig ist von der Menge an transfiziertem Reporterplasmid.

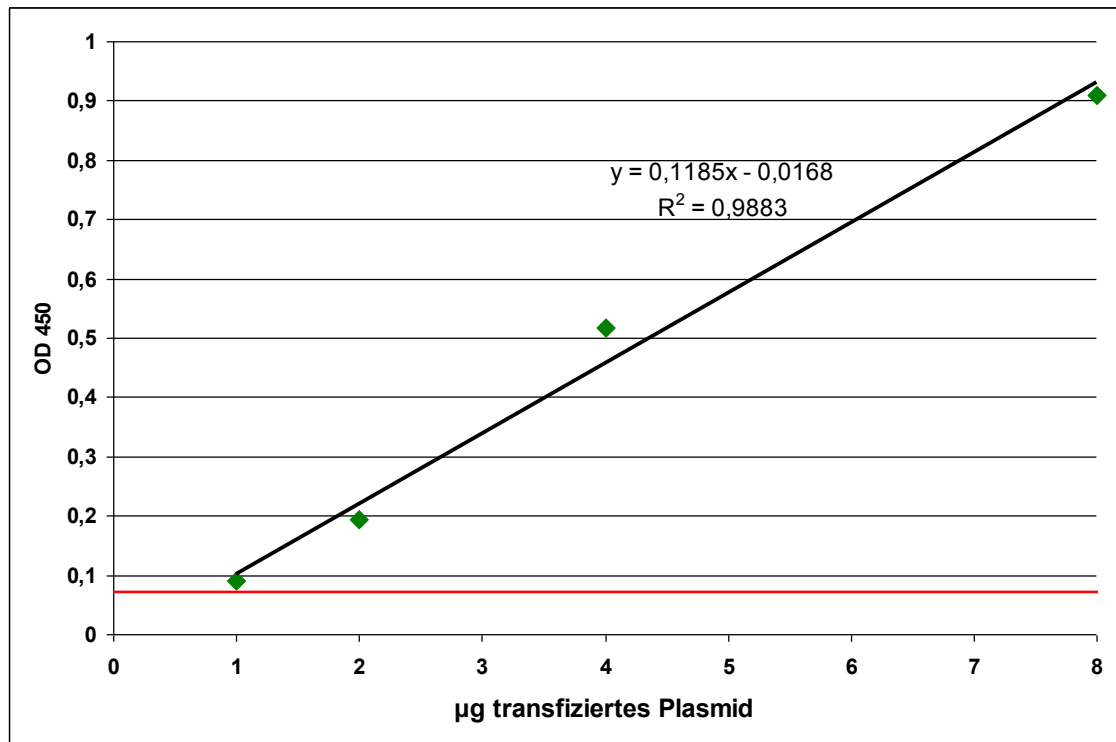


Abbildung 14: SEAP-Signal in Abhängigkeit der transfizierten Plasmidmenge

Es ist die OD₄₅₀ der in den SEAP-Assay eingesetzten Zellkulturüberstände aus den Transfektionen mit unterschiedlichen Mengen an Reporterplasmid (1 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg) gezeigt. Die rote Linie stellt den Cut-off dar. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus Doppelansätzen. Die schwarze Linie stellt die lineare Regressionsgerade dar. Die Gleichung und das Bestimmtheitsmaß sind links neben der Regressionsgeraden angegeben.

4.1.2 Vergleich verschiedener Transfektionsreagenzien mit Hilfe von Reporterkonstrukten

Die Effizienz der Transfektion ist entscheidend für die Nachweisgrenze des phänotypischen Assays. Aus diesem Grund wurden verschiedene Transfektionsreagenzien durch Messung der erzeugten SEAP-Konzentrationen im Überstand transfizierter HuH7-München Zellen miteinander verglichen. Zusätzlich wurden HuH7-München Zellen ebenfalls mit pmaxGFP transfiziert um den Anteil der transfizierten Zellen abschätzen zu können. Die Transfektion mit FuGene HD erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die anderen Transfektionen erfolgten jeweils nach Herstellerangaben. Sowohl bei der Transfektion mit pSEAP2-control als auch bei der Transfektion mit pmaxGFP zeigten die mit FuGene HD transfizierten Zellen die deutlich stärkste Expression. Im weiteren Verlauf wurde deshalb dieses Reagenz für alle Transfektionen verwendet.

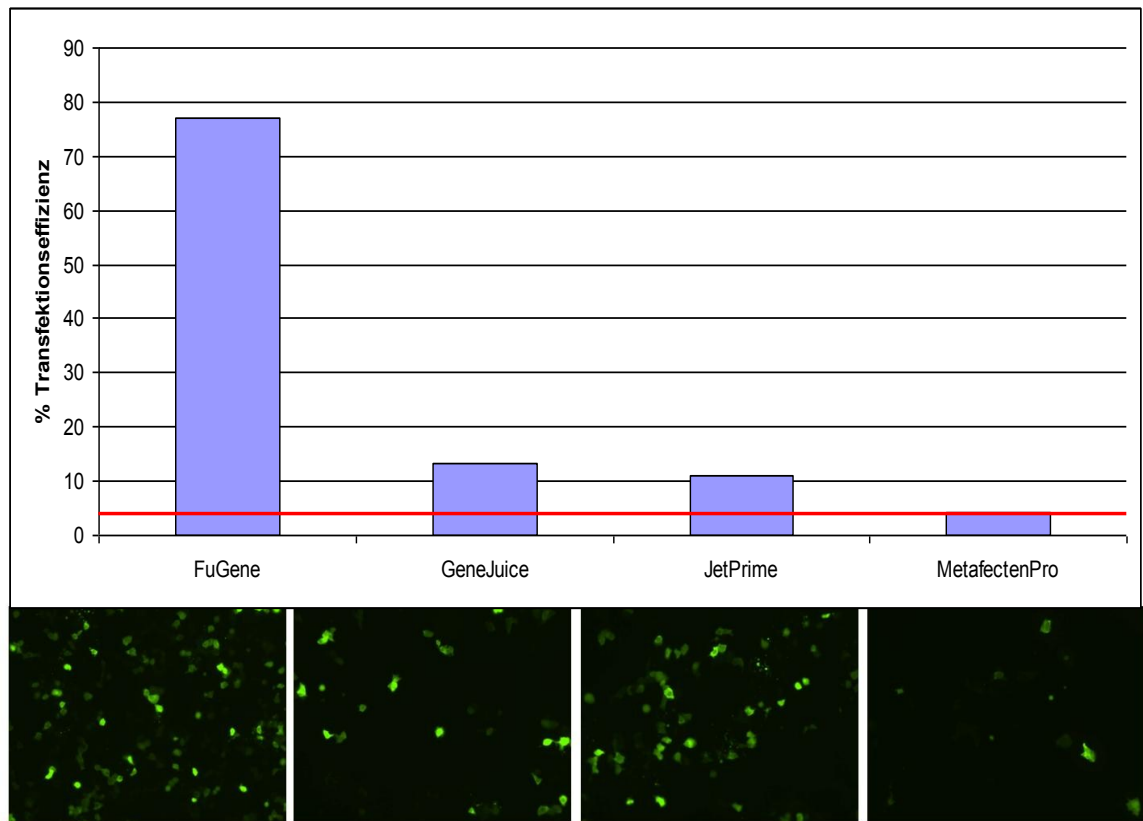


Abbildung 15: Vergleich der Transfektionseffizienz verschiedener Reagenzien

Das SEAP-Signal ist angegeben in % Transfektionseffizienz im Vergleich zum laborinternen Standard (siehe 3.11.2.1). Die Messung erfolgte jeweils im Doppelansatz. Es sind die Mittelwerte gezeigt. Die rote Linie entspricht dem Cut-off. Darunter sind jeweils die entsprechenden GFP-Signale nach 2 Sekunden UV-Belichtung dargestellt. Nach der Transfektion wurden die Zelle für drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Signale der Reporterkonstrukte ermittelt.

4.1.3 Verringerung des plasmidbedingten Hintergrundsignals der Real-Time-PCR

Bei der Messung der neu produzierten HBV-Genome im Zellkulturüberstand mittels Real-Time-PCR, ist das Hauptproblem die ungewollte Detektion der von der Transfektion stammenden HBV-Plasmide. Diese sind in großem Überschuss im Überstand enthalten und würden ohne zusätzliche Maßnahmen die Quantifizierung der Replikation verhindern. Diesen Umstand soll die diskriminative HOPE-PCR verhindern. Mit Hilfe verschiedener Templates wurde untersucht, wie effektiv die Unterscheidung zwischen den natürlich vorkommenden HBV-Genomen und dem Transfektionskonstrukt ist. Als Positivkontrolle wurde außerdem ein Plasmid mit einem HBV-Dimer (T7-Dimer) eingesetzt, welches die Bindestellen für die PCR in gleicher Form wie im natürlichen HBV-Genom enthält.

In Abbildung 16 wird deutlich, dass die spezielle HOPE-PCR die Plasmid-DNA um etwa 3 Logstufen schwächer detektiert als die natürliche HBV-DNA. Das HBV-Dimer-Plasmid wird durch die PCR am besten nachgewiesen und zeigt bei der Quantifizierung etwa vier Mal mehr Genomäquivalente an, als eingesetzt

wurden. Dieses Plasmid hat allerdings auch die doppelte Anzahl an Bindestellen für die eingesetzten Primer.

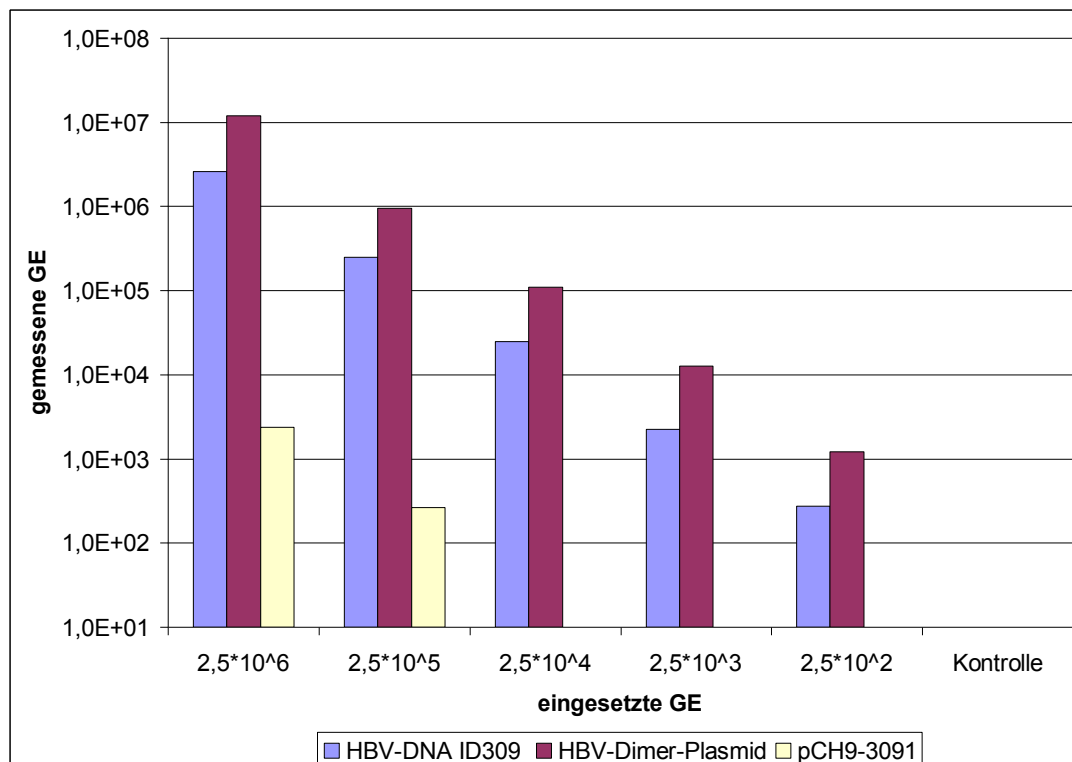


Abbildung 16: HOPE-PCR mit verschiedenen Templates

Die absolute Menge an eingesetzten GE des jeweiligen Templates ist gegen die absolute Menge an gemessenen GE aufgetragen. Als Kontrolle diente DNA-feies Wasser

Um die Spezifität des Tests zu erhöhen wurde versucht den Plasmidhintergrund durch Waschschritte zu senken. Dazu wurden HuH7-München Zellen mit 7 µg pCH9-3091 und 1 µg pSEAP2-control transfiziert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden anschließend entweder direkt mit 2% FKS DMEM ohne Phenolrot 3 Tage kultiviert oder zuvor 1 mal oder 2 mal mit 10 ml PBS oder 2 mal mit 10 ml 2% FKS DMEM gewaschen. Die Überstände wurden aufgereinigt und sowohl in eine X-PCR als auch in eine HOPE-PCR eingesetzt. Um die generelle Expression zu ermitteln wurden die Überstände ebenfalls für einen SEAP-Assay verwendet.

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass das Waschen mit PBS nur einen sehr geringen Effekt auf die Menge an detektierten Plasmiden durch die X-PCR hat. Der größte Effekt verringert das Signal um 50% und ist bei zweifachem Waschen mit PBS zu beobachten. Die Menge der durch die HOPE-PCR detektierten neu produzierten Genomequivalente wird ungefähr gleich stark beeinflusst. Das Waschen mit 2% FKS DMEM scheint keinen Einfluss auf die Menge an detektierten Genomen und Plasmiden zu haben. Sehr ähnliche Veränderungen sind auch bei den Mengen an SEAP im Überstand zu beobachten (Abbildung 18).

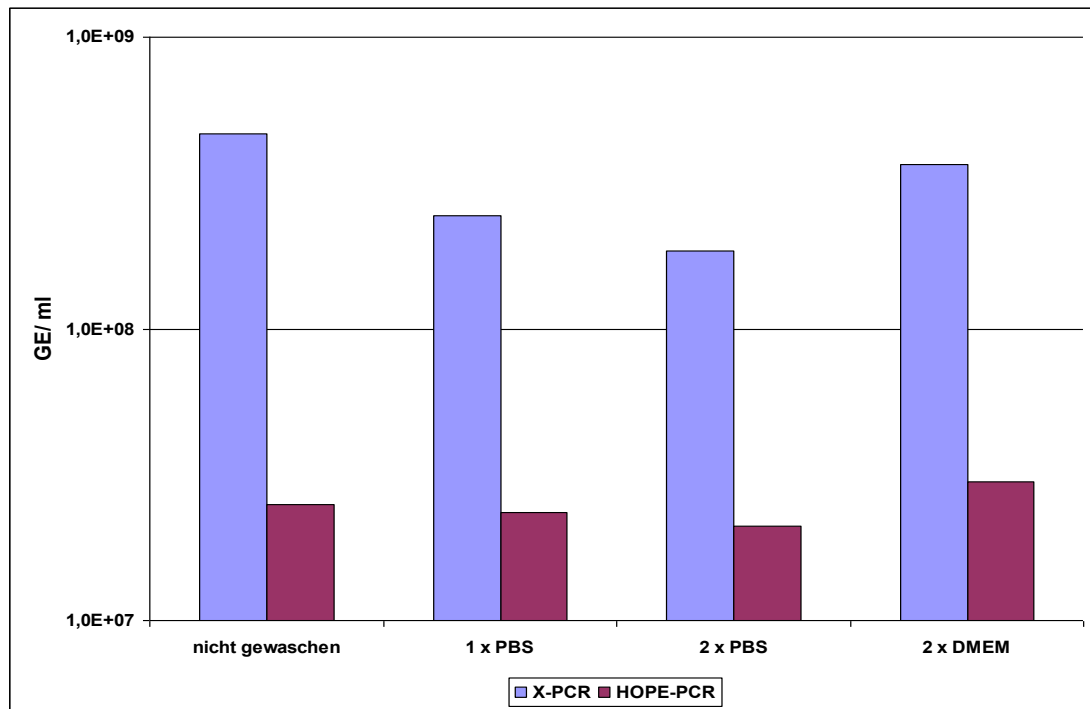


Abbildung 17: Menge an detektiertem Signal mit den aufgeführten Real-Time-PCRs

Die Zellen wurden mit pCH9-3091 (7 µg), sowie pSEAP2-control (1 µg) transfiziert. Am nächsten Tag wurde der Überstand durch neues Medium ersetzt und wie in der Grafik angegeben zuvor gewaschen. Nach drei Tagen Inkubation wurde der Überstand aufgereinigt und in die angegebenen PCRs eingesetzt (siehe 3.10.1 und 3.10.2). Es ist jeweils der Mittelwert aus zwei Werten gezeigt.

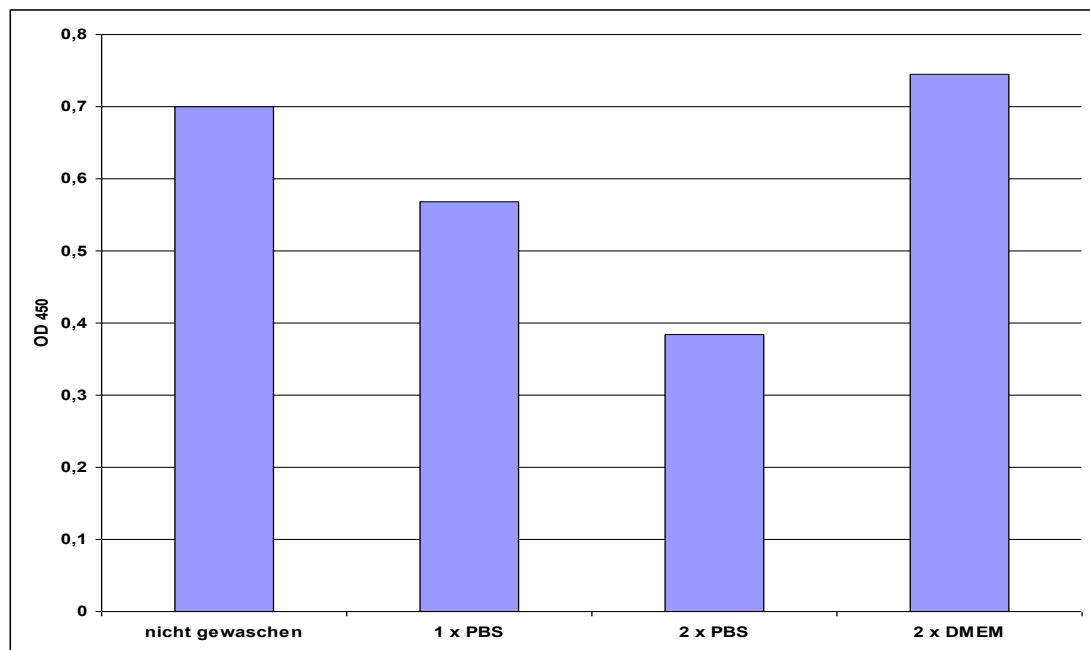


Abbildung 18: Menge an SEAP (OD₄₅₀) im Überstand nach den angegebenen Waschschritten

Die Zellen wurden mit pCH9-3091 (7 µg), sowie pSEAP2-control (1 µg) transfiziert. Am nächsten Tag wurde der Überstand durch neues Medium ersetzt und zuvor durch Wechseln des Überstandes (wie in der Grafik angegeben) gewaschen. Nach drei Tagen Inkubation wurden je 50 µl des Überstands in den SEAP-Test eingesetzt (siehe 3.11.2). Es ist jeweils der Mittelwert aus Doppelansätzen gezeigt.

Eine weitere Möglichkeit die Plasmide aus der Zellkultur zu entfernen ist das Waschen durch Resuspendieren der Zellen in Medium. Bei diesem Versuch wurde das Plasmid pcX (enthält den X-ORF des HBV) transfiziert, welches zwar durch die X-PCR detektierbar ist, aber keine neuen HBV-Genome produzieren kann. Anstatt nur den Überstand nach der Transfektion zu wechseln, wurden die Zellen hierbei von der Zellkulturschale abtrypsiniert und in DMEM mit 2% FKS unterschiedlich oft pelletiert und resuspendiert. Nach den Waschschritten wurden die Zellen in DMEM mit 2% FKS ohne Phenolrot resuspendiert und auf eine neue Zellkulturschale gegeben. Nach 3 Tagen Inkubation wurde die Menge an Plasmiden detektiert.

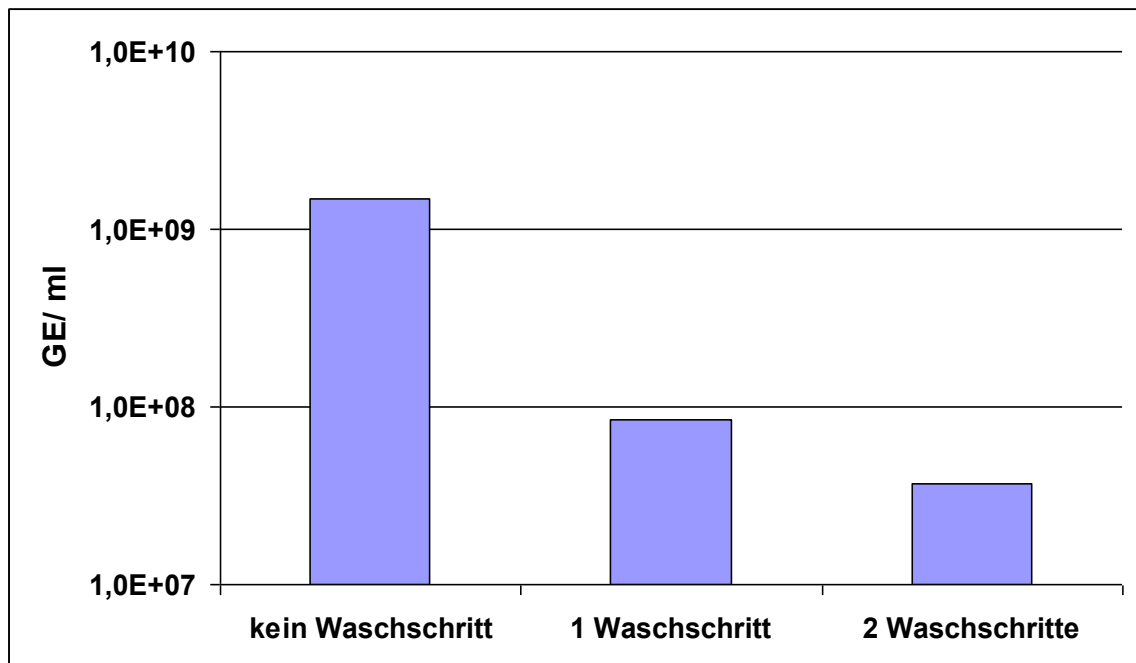


Abbildung 19: Transfektion von HuH7-München mit pcX

Die Zellen wurden mit 8µg pcX transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Abtrypsinierung und anschließender Zentrifugation gewaschen (siehe 3.11.1). Die Menge an verbliebenem pcX-Plasmid nach unterschiedlich vielen Waschschriffen und 3 Tagen Inkubation wurde mit der X-PCR ermittelt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus Doppelansätzen.

In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die Menge an Plasmid nach einem Waschschriff um etwa Faktor 10 und nach zwei Waschschriffen um insgesamt mehr als Faktor 30 abgenommen hat.

Parallel wurde ein Experiment mit pCH9-3091 transfizierten HuH7-München Zellen durchgeführt (Abbildung 20). Zur Detektion der neu gebildeten Genome wurde die diskriminative HOPE-PCR eingesetzt. Hierbei wurde ein Teil der Zellen mit 100 µM Lamivudin und ein Teil der Zellen ohne Inhibitor für drei Tage inkubiert. Die mit Lamivudin inhibierten Zellkulturen sollten kein neues Virus produzieren und zeigen somit den Hintergrund der diskriminativen PCR.

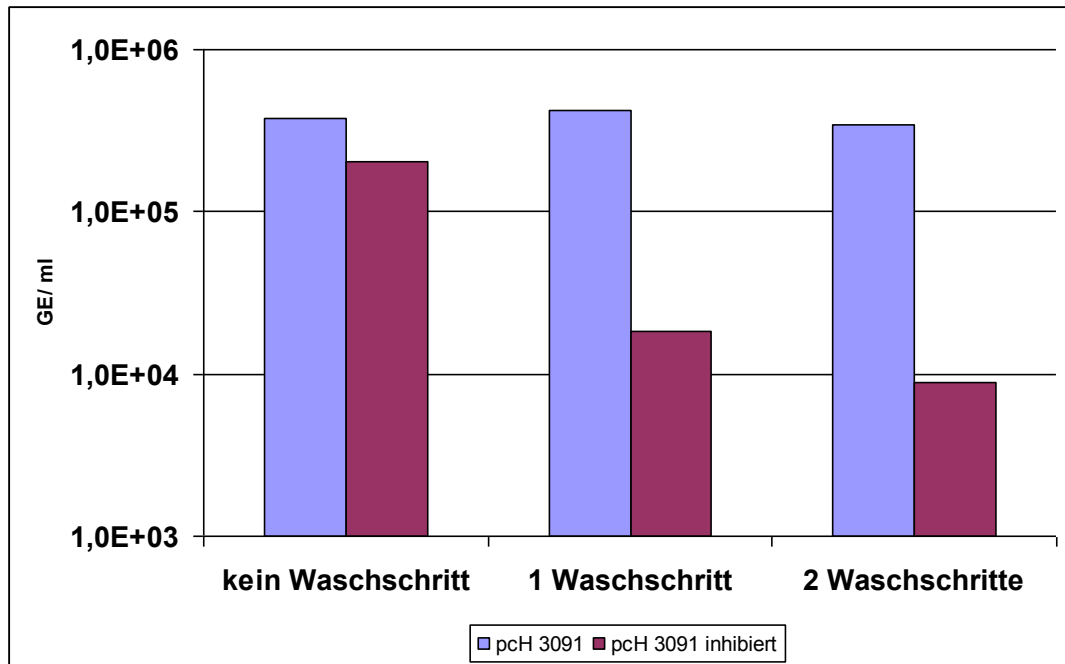


Abbildung 20: Transfektion mit pCH9-3091 mit und ohne Inhibitor

Die Zellen wurden mit pCH9-3091 transfiziert, abtrypsiniert und durch Zentrifugation und Resuspendierung gewaschen. Nach unterschiedlich vielen Waschschritten und anschließender dreitägiger Inkubation mit oder ohne 100µM Lamivudin (Inhibitor) (siehe 3.11.1), wurde die Menge an Genomen im Überstand durch die HOPE-PCR ermittelt (siehe 3.11.3 und 3.11.4). Die Werte stellen jeweils den Mittelwert aus 2 Messwerten dar. Für den Wert des nicht inhibierten Ansatzes ohne Waschschrift stand nur eine Messung zur Verfügung.

In Abbildung 20 wird deutlich, dass die Waschschrritte den plasmidbedingten Hintergrund deutlich senken. Die Abnahme der detektierten HBV-Genome im Überstand der Zellen verhält sich dabei ähnlich wie bei dem Versuch mit pCX (Abbildung 19). Die Menge an nachgewiesenen HBV-Genomen bei den Zellen ohne Inhibitor wird durch die Waschschrritte nicht verändert.

4.1.4 Optimierung der Inkubationsdauer

Die Optimierung der Inkubationsdauer ist von entscheidender Bedeutung für die Geschwindigkeit und Sensitivität des phänotypischen Tests. Es stellte sich die Frage ob die Kultivierungszeit auf nur 2 Tage verkürzt werden kann. Um diese Frage zu klären wurden HuH7-München Zellen mit pCH9-3091 transfiziert, am nächsten Tag 3 mal mit 2% FKS DMEM ohne Phenolrot durch Resuspension gewaschen und auf 96-Well Zellkulturformat ausgesät. Dabei wurden je vier Wells mit 100 µM Lamivudin und 4 Wells ohne Inhibitor inkubiert. Nach 2 Tagen wurde der Überstand von je 2 Wells entnommen. Nach einem weiteren Tag wurde die restlichen Überstände entnommen. Die Menge an produzierten Genomen wurde mittels HOPE-PCR festgestellt.

Aus Abbildung 21 geht hervor, dass ein dritter Inkubationstag die Menge an produziertem Virus um etwa eine Logstufe erhöht während der Hintergrund relativ konstant bleibt. Eine Verkürzung der Inkubation auf nur 2 Tage geht mit einer verminderten Sensitivität des Tests einher.

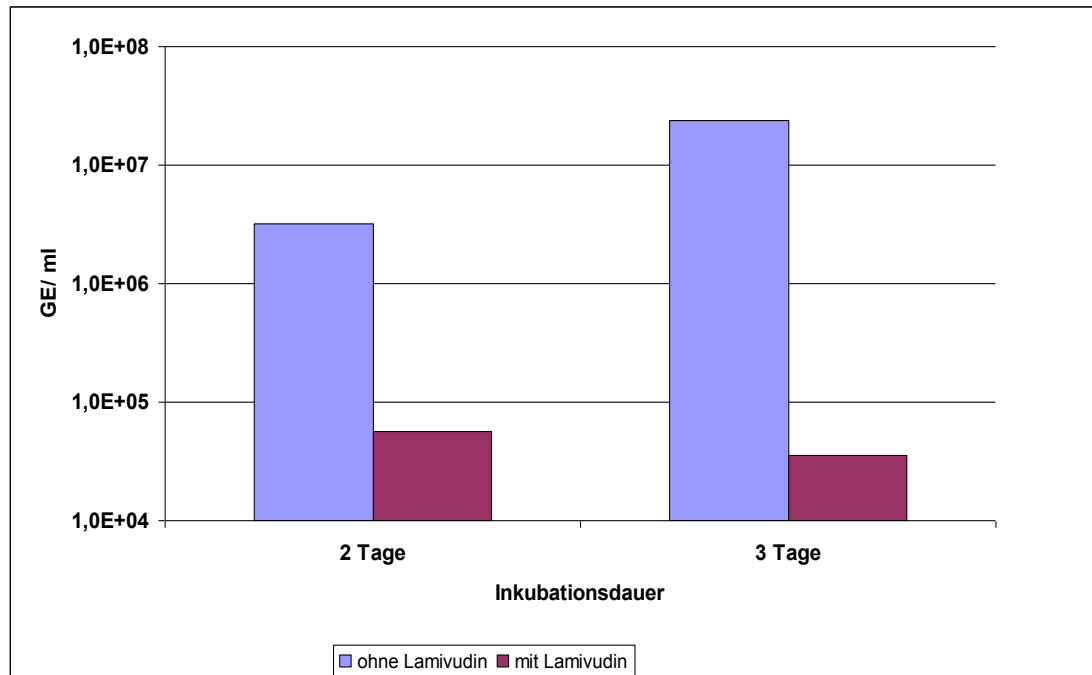


Abbildung 21: Genommengende bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Die Zellen wurden wie in 3.11.1 beschrieben nach der Transfektion mit pCH9-3091 gewaschen und anschließend für 2 oder 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Überstände nach Aufreinigung in eine HOPE-PCR eingesetzt. Dargestellt sind die ermittelten Genomzahlen pro ml nach 2 oder 3 Tagen Inkubation mit oder ohne 100 µM Lamivudin. Es ist jeweils der Mittelwert aus einem Doppelansatz zu sehen.

4.2 Evaluierung des phänotypischen Tests anhand des HBV-Wildtypplasmids

Nach der grundlegenden Etablierung des Tests wurde das HBV-Wildtypplasmid verwendet um die Genauigkeit und Sensitivität des Tests sowie die generelle Wirksamkeit der klinisch relevanten Inhibitoren festzustellen. Dazu wurde der phänotypische Assay wie im Methodenteil beschrieben insgesamt 10 mal nacheinander mit pCH9-3091 durchgeführt. Die IC_{50} -Werte für die einzelnen Nukleo(s)tidanaloga sowie die Standardabweichung und die maximale Inhibition wurden bestimmt.

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass alle vier Inhibitoren in der Lage sind die Virusreplikation deutlich zu hemmen. Die Inhibitionskurven zeigen dabei jeweils einen linearen Bereich, der für die Regression verwendet werden kann. Adefovir und Tenofovir weisen eine sehr ähnliche IC_{50} von etwa 1000 nM auf, während die IC_{50} von Lamivudin um etwa Faktor 10 und die IC_{50} von Entecavir um etwa Faktor 1000 geringer ist. Die IC_{50} -Werte, die direkt aus den Datenpunkten der Konsensuskurve berechnet wurden (Tabelle 12 oben rechts) sind den Mittelwerten aller IC_{50} -Berechnungen sehr ähnlich.

Bei maximal eingesetzter Menge an Inhibitor wird jeweils weniger als 1% der ursprünglichen Replikation gemessen (Tabelle 12 unterer Teil). Der phänotypische Test hat beim Wildtyp damit einen Messbereich von etwa 2 Logstufen. Die Standardabweichung der durchschnittlichen IC_{50} ist in Tabelle 12 angegeben und beträgt jeweils etwa 40%.

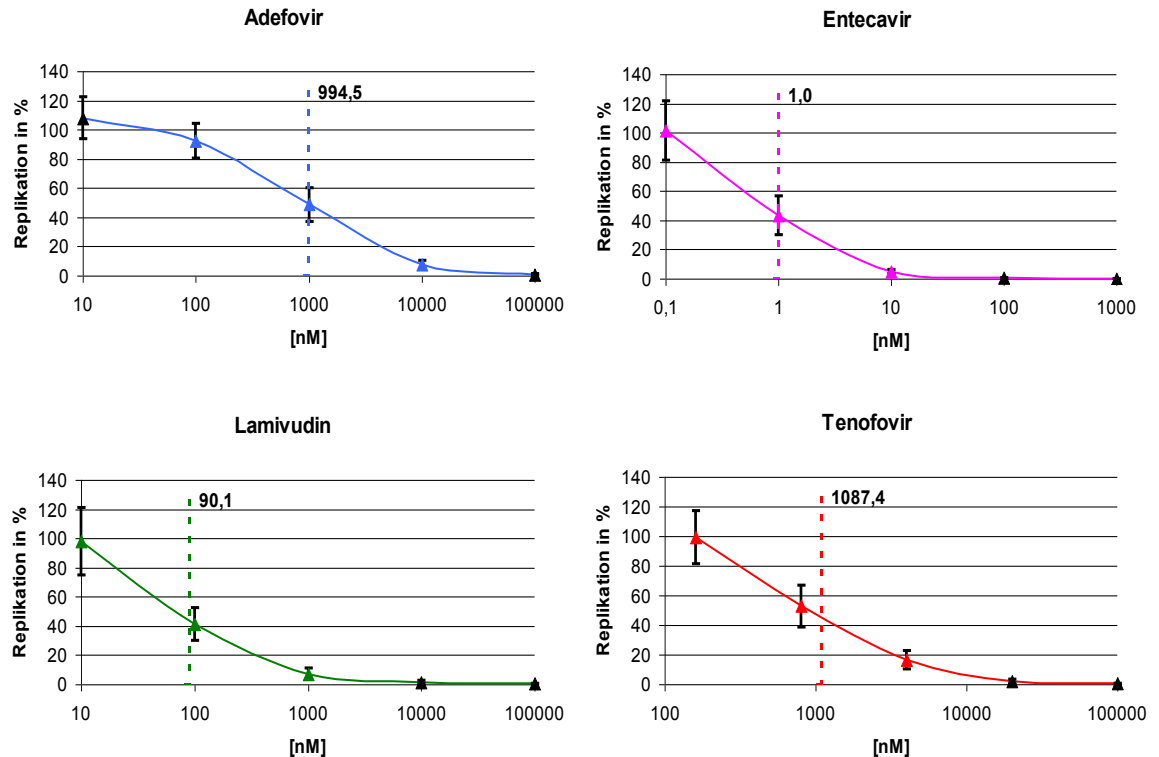


Abbildung 22: Konsensus der konzentrationsabhängigen Inhibition der HBV-Replikation des Wildtyps mit klinisch relevanten RT-Inhibitoren

Dargestellt ist jeweils die relative Replikation in % in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Inhibitors in nM. Die Kurven stellen den Konsensus aus 30 einzelnen Inhibitionskurven dar (10 Versuche, jeweils mit 3fach Ansatz). Die gestrichelte Linie zeigt die errechnete IC₅₀ aus dem Mittelwert der IC₅₀ der einzelnen Kurven. Der entsprechende Wert in nM ist rechts davon angegeben. Die für die lineare Regression verwendeten Datenpunkte der Kurven sind jeweils farbig hervorgehoben.

Tabelle 12: Daten der Wildtypkurven aus Abbildung 22

	ø IC ₅₀ nM	Stabw.	Stabw. %	IC ₅₀ Konsensuskurve	
Adefovir	994,5	269,4	27,1	980,3	
Entecavir	1,0	0,4	42,6	1,0	
Lamivudin	90,1	42,8	47,5	94,6	
Tenofovir	1087,4	437,3	40,2	1025,3	
Adefovir [nM]	ø Replikation in %	Stabw.	Entecavir [nM]	ø Replikation in %	Stabw.
100000	0,76	0,46	1000	0,12	0,09
10000	7,76	2,65	100	0,56	0,33
1000	48,72	11,30	10	4,77	1,51
100	92,43	12,18	1	43,73	13,29
10	107,89	14,30	0,1	101,34	20,41
Lamivudin [nM]	ø Replikation in %	Stabw.	Tenofovir [nM]	ø Replikation in %	Stabw.
100000	0,43	0,31	100000	0,36	0,41
10000	1,44	1,07	20000	2,24	1,43
1000	7,25	3,79	4000	16,82	6,20
100	41,33	11,20	800	52,94	14,10
10	98,11	22,87	160	99,32	17,81

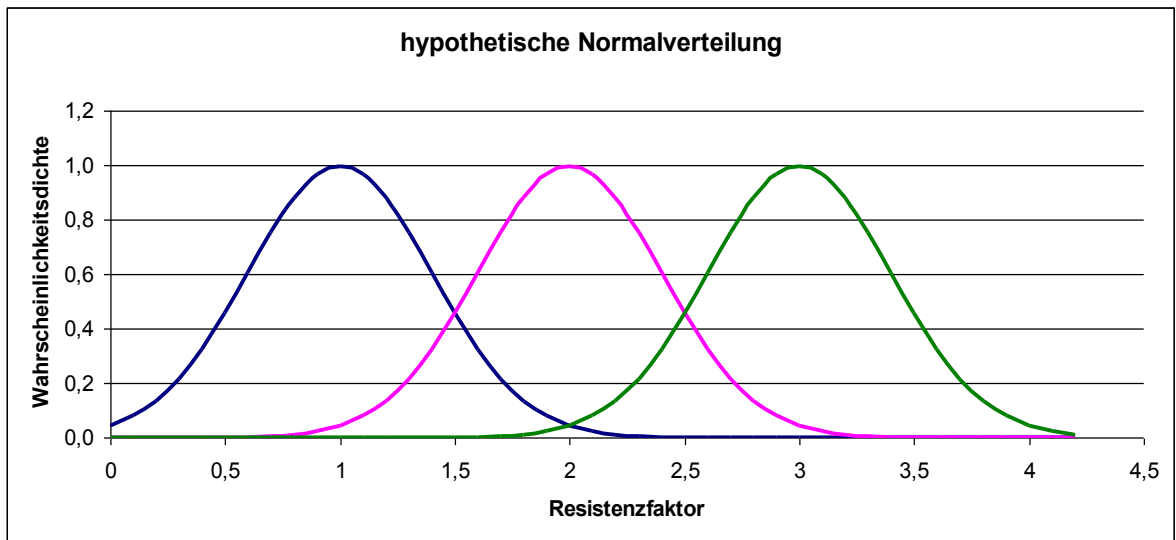


Abbildung 23: Hypothetische Normalverteilung der Resistenzfaktoren

Dargestellt sind die hypothetischen Wahrscheinlichkeitsdichten gegen den Resistenzfaktor für HBV-Varianten mit einem mittleren Resistenzfaktor von: blau = 1 (Wildtyp), lila = 2 und grün = 3.

Mit Hilfe der Standardabweichung lässt sich die normalverteilte Wahrscheinlichkeitsdichte des ermittelten Resistenzfaktors darstellen. Geht man von einer ähnlich hohen Standardabweichung ($\pm 0,4$ Resistenzfaktor) bei den resistenten HBV-Varianten aus, lässt sich auch hier eine Wahrscheinlichkeitsverteilung darstellen.

Die Schnittmengen der Wahrscheinlichkeitsdichten für Virusvarianten mit einem Resistenzfaktor von 2 überschneiden sich deutlich mit denen des Wildtyps (Resistenzfaktor 1) während Virusvarianten mit einem Resistenzfaktor von 3 nur sehr geringe Überschneidungen ihrer Wahrscheinlichkeitsdichten mit dem Wildtyp aufweisen.

4.3 Resistenzprofile der Patientenisolat des HOPE-Projekts

Für die in Punkt 2.6 Tabelle 4 und 5 aufgeführten Patientenisolat wurden mit Hilfe des entwickelten phänotypischen Tests Resistenzprofile für alle vier klinisch relevanten Nukleo(s)tidanaloga erstellt. Die Patientenisolat sind im Folgenden in Gruppen eingeteilt, die sich nach der Resistenz gegen einen bestimmten Inhibitor, sowie nach bekannten primären Resistenzmutationen richten. Die errechneten Resistenzfaktoren beziehen sich jeweils auf die in Tabelle 12 angegebenen mittleren IC_{50} Werte der Wildtypen des HOPE-Projekts. Aufgrund der Fülle an Daten werden nicht alle 176 Inhibitionskurven gezeigt, sondern jeweils das Resistenzprofil eines Isolates als typisches Beispiel dargestellt. Die restlichen Ergebnisse werden jeweils in einer Tabelle zusammengefasst. Zur einfacheren Beschreibung werden die Isolate mit den Bezeichnungen P1 bis P44 durchnummeriert. In den aufgeführten Tabellen sind Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir mit ADV, ETV, LMV und TDF abgekürzt, sowie

Genotyp mit GT. Die Resistenzfaktoren sind mit verschiedenen Farben hinterlegt, die die Stärke der ermittelten Resistenz darstellen: grün = keine Tendenz für eine Resistenz erkennbar, gelb = Tendenz zur Resistenz erkennbar, orange = signifikante In- vitro-Resistenz, rot = hohe in-vitro-Resistenz

4.3.1 Patientenisolat ohne bekannte Resistenzmutationen

Die Untersuchung von Patientenisolaten ohne bekannte Resistenzmutationen dient zum einen zur Etablierung einer Kontrollgruppe, die es erlaubt die Genauigkeit des Tests zu ermitteln und zum anderen dazu noch unbekannte Primärmutationen innerhalb des RT-Bereichs ausfindig zu machen. Insgesamt wurden 5 Patientenisolat ohne bekannte Resistenzen getestet. P3 (RK266-1) ist als typisches Beispiel in Abbildung 24 dargestellt. Die Daten der Tests sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Daten von P1 bis P5

Patientenisolat	Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
			ADV	ETV	LMV	TDF	
P1: FvB-153-1	keine Mutation (214A)	D	2,4	0,9	2,3	6,1	212,0
P2: FvB-161-4	keine Mutation (214A)	D	1,3	1,3	1,6	1,3	12,2
P3: RK-266-2	keine Mutation	C	1,4	1,4	1,0	1,7	5,6
P4: FvB-162-1	keine Mutation	B	2,6	0,4	1,2	0,4	32,3
P5: FvB-169-2	keine Mutation	B	1,0	0,4	1,2	1,3	13,6

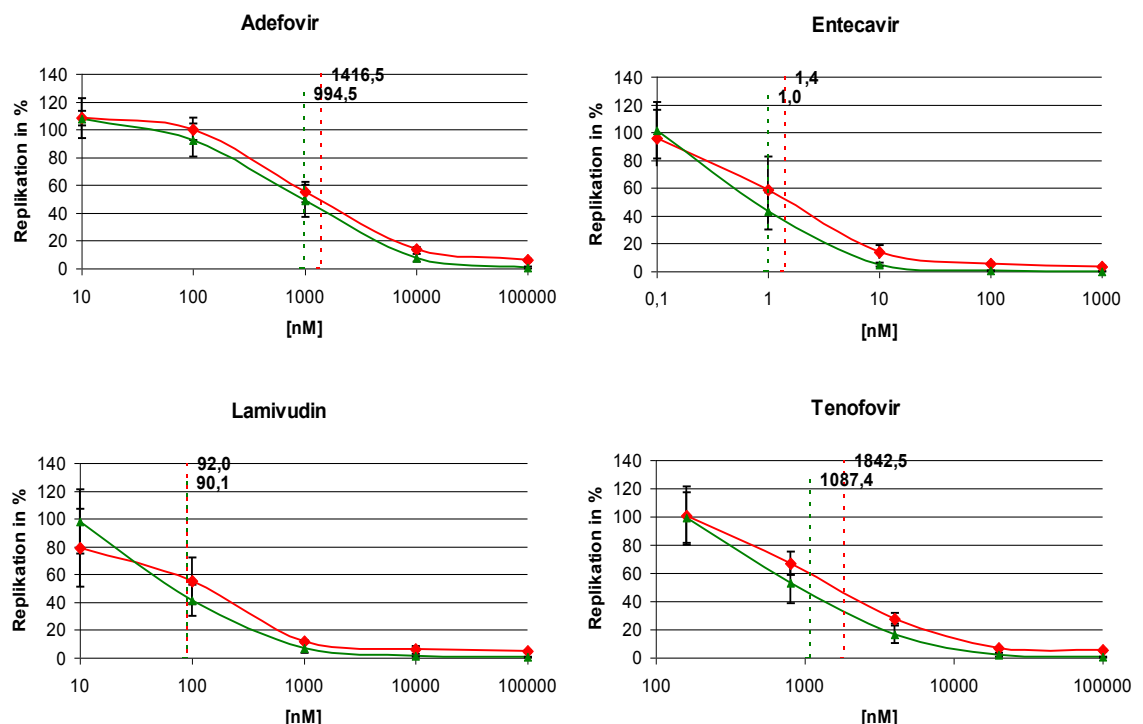


Abbildung 24: Resistenzprofil einer Variante ohne bekannte Resistenzmutationen am Beispiel von P3 (RK266-1): Die grüne Linie stellt die Konsensuskurve des Wildtyps dar. Die rote Linie stellt die Resistenzkurven von P3 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

Die Isolate P2 bis P5 ohne bekannte Mutationen zeigen keine nachweisbaren Resistenzen. Nur bei P4 ist ein leicht erhöhter Resistenzfaktor zu erkennen, der aber noch nicht als signifikant anzusehen ist. Auch die Fitnesswerte der Isolate P2 bis P5 lassen keine Zusammenhänge erkennen und bewegen sich zwischen 5,6% und 32,3 %. Sie sind damit alle deutlich geringer als die Fitness des eingesetzten Wildtypplasmids. Eine Besonderheit stellt P1 dar. Bei diesem Isolat ist eine signifikante Resistenz gegenüber Tenofovir, sowie eine eventuelle Resistenz gegenüber Adefovir und Lamivudin zu erkennen. Die Fitness dieser Variante ist mit 212% deutlich größer als die des Wildtyps und außergewöhnlich hoch. Die bei dieser Variante vorhandene Mutation rtV214A steht im Verdacht eine mittlere Adefovir-Resistenz zu bewirken (Ghany und Liang 2007). Diese Mutation ist allerdings auch bei der komplett resistenzfreien Variante P2 zu finden. Sowohl P1 als auch P2 besitzen zusätzlich eine nonsense-Mutation an Stelle 69 des SHBs-ORF (siehe Anahng). Dies verursacht mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Sekretionsdefizienz. Das Resistenzprofil von P1 im Vergleich zum Wildtyp ist in Abbildung 25 für die vier klinisch relevanten Nukleosidanaloga grafisch dargestellt.

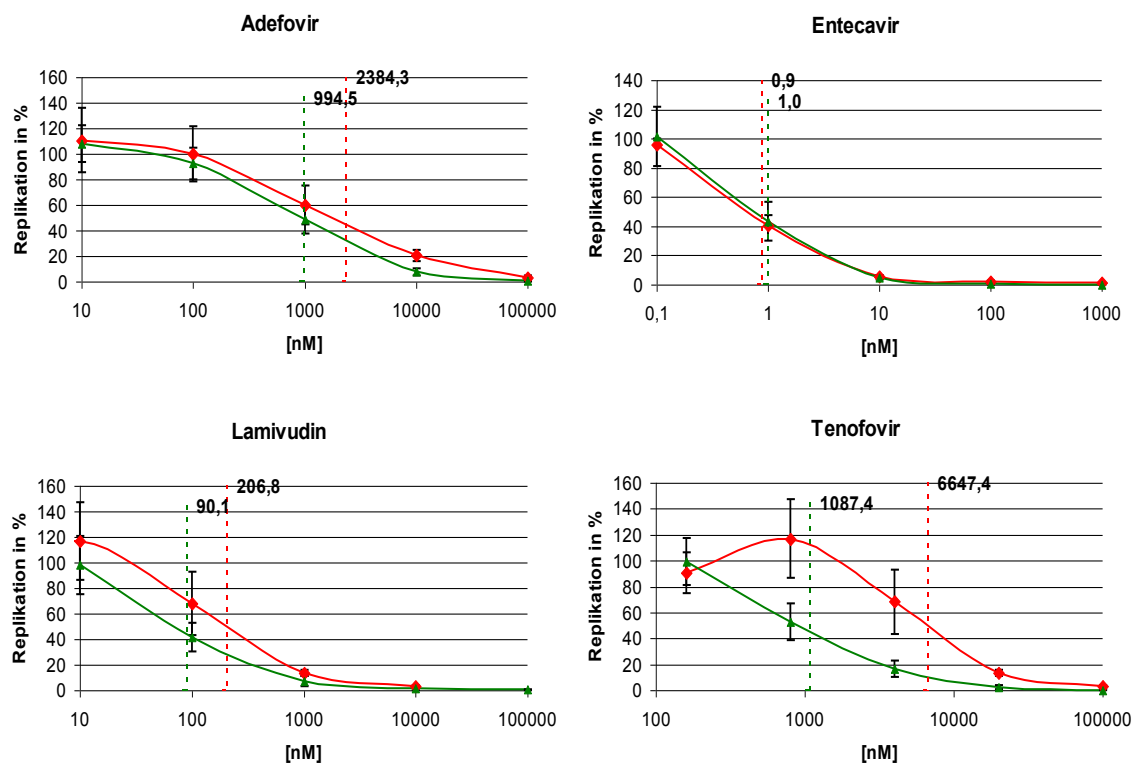


Abbildung 25: Resistenzprofil des Patientenisolats P1

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P1 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC_{50} an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.3.2 Patientenisolate mit Lamivudin-Resistenzmutationen

Die am häufigsten vorkommenden Mutationen, welche zur Resistenz gegen Lamivudin führen, liegen im zentralen YMDD-Motif der reversen Transkriptase

und führen zu einem Austausch des Methionins an Position 204 zu Valin oder Isoleucin (rtM204V, rtM204I). Neben diesen Primärmutationen können noch weitere Mutationen vorkommen. Dazu zählen vor allem Veränderungen der Aminosäuresequenzen an den Positionen 80, 173, 180 und 215. Von diesen Mutationen wird angenommen, dass sie einen kompensatorischen Effekt auf die Replikationsfähigkeit der mutierten Virusvarianten ausüben. Sie werden deshalb auch als Sekundärmutationen bezeichnet. Die lamivudinresistenten Patientenisolat werden nachfolgend in zwei Gruppen eingeteilt, die sich nach der vorliegenden Primärmutation richten.

4.3.2.1 Isolate mit der Primärmutation rtM204V

Eine der beiden bekannten Primärmutationen für Lamivudin-Resistenz ist rtM204V. Laut Literatur führt diese Mutation zu einer sehr hohen Resistenz gegen Lamivudin und einer verringerten Suszeptibilität gegenüber Entecavir. Die Mutation soll keinen Einfluss auf die Adefovir- und Tenofovir-Resistenzen ausüben (Ghany und Liang 2007). Sie ist sehr häufig mit der Sekundärmutation rtL180M assoziiert (Warner et al. 2007). Im Rahmen der Arbeit wurden insgesamt 13 Patientenisolat mit dieser Mutation charakterisiert, wobei alle Varianten ebenfalls die Mutation L180M und teilweise eine weitere Mutation besaßen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Als Beispiel eines üblichen Resistenzprofils bei dieser Mutation ist P6 in Abbildung 26 gezeigt.

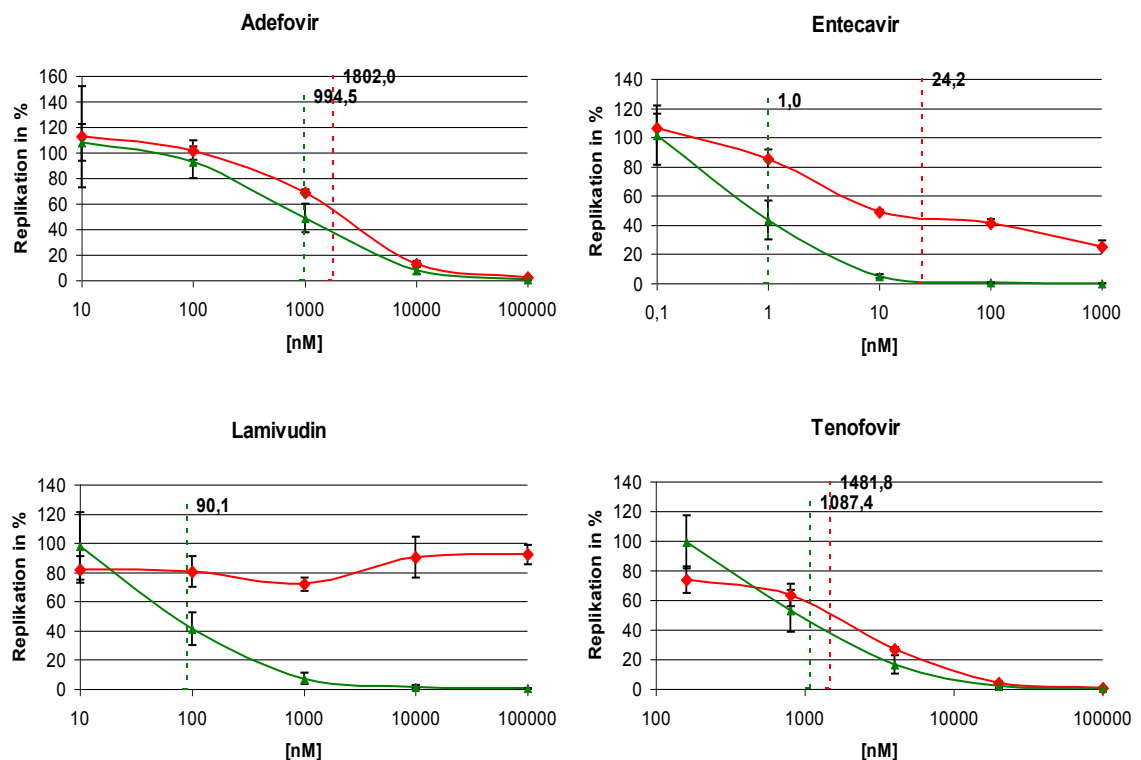


Abbildung 26: Typisches Resistenzprofil am Beispiel von P6 (180M,204V)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P6 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

In Abbildung 26 zeigt sich das typische Bild der M204V-Mutation mit wildtypähnlichen Kurvenverläufen bei Adefovir und Tenofovir, einer flach sinkenden Kurve für Entecavir, die eine leichte Resistenz anzeigt sowie eine sehr hohe Resistenz gegen Lamivudin. Innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs von Lamivudin ist keinerlei Wirkung des Inhibitors auf die virale Replikation von P6 mehr zu erkennen, weshalb auch keine IC₅₀ bestimmt werden kann.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Daten von P6 bis P18

Patientenisolat		Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
				ADV	ETV	LMV	TDF	
P6	FvB-166-3	180M,204V	B	1,8	24,1	>1110	1,4	2,9
P7	FvB-165-2	180M,204V	A	0,7	28,3	>1110	2,5	92,7
P8	FvB-154-9	180M,204V	A	1,3	15,8	>111	2,4	88,6
P9	FvB-157-1	180M,204V	A	1,3	12,7	>111	5,6	45,2
P10	RK-224-5	180M,204V	A	4,0	22,5	>1110	1,6	24,1
P11	RK-16-5	180M,204V	A	3,0	9,6	>1110	2,6	10,3
P12	RK-172-2	180M,204V	A	3,9	2,2	>1110	6,4	6,8
P13	RK-2-1	80V,180M,204V,215S	D	0,9	200,8	>1110	1,1	58,8
P14	FvB-175-9	173L,180M,204V	D	1,0	2,9	>1110	2,6	2,6
P15	RK-172-3	173L,180M,204V	A	3,0	4,4	>1110	2,4	10,4
P16	FvB-172-1	173L,180M,204V	A	4,1	263,8	>1110	6,1	7,2
P17	FvB-154-2	173L,180M,204V	A	5,2	10,0	>111	7,4	6,2
P18	FvB-169-4	173L,180M,204V	A	1,1	10,2	>1110	2,5	1,7

Aus Tabelle 14 geht hervor, dass alle Varianten mit 204V und 180M eine sehr hohe Resistenz gegenüber Lamivudin besitzen. Die mittlere Resistenz gegen Entecavir ist ebenfalls bei den meisten Isolaten zu beobachten. P12 und P14 zeigen jedoch nur eine sehr geringe Erhöhung der Resistenzfaktoren und P13 sowie P16 zeigen eine erhöhte Resistenz.

Die Patientenisolate mit den Resistenzmutationen 173L, 180M und 204V zeigen alle eine deutlich verminderte Fitness aber meist auch eine erhöhte und häufig signifikante Resistenz gegen Adefovir und/oder Tenofovir. Die getesteten Varianten mit den Mutationen 204V und 180M zeigen ebenfalls teilweise signifikante Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir. Betrachtet man aus dieser Gruppe nur die Isolate mit Genotyp A, zeigt sich, dass die erhöhte Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir mit einer verminderten Fitness korreliert. So weisen P7 und P8 keine signifikanten Resistenzen auf und haben gleichzeitig die höchsten Fitnesswerte. Insgesamt sind die Resistenzprofile der M204V-Varianten recht heterogen.

P13 fällt mit einem außergewöhnlichen Resistenzprofil, sowie hoher Entecavir-Resistenz aus dem Rahmen. Dieses Isolat besitzt als einziges die Mutationen rtL80V sowie rtQ215S. P16 fällt in diesem Bild besonders auf, mit signifikanten

Resistenzen gegen alle vier Inhibitoren und sehr hohen Resistenzen gegen Lamivudin und Entecavir. Das entsprechende Resistenzprofil ist in Abbildung 27 dargestellt.

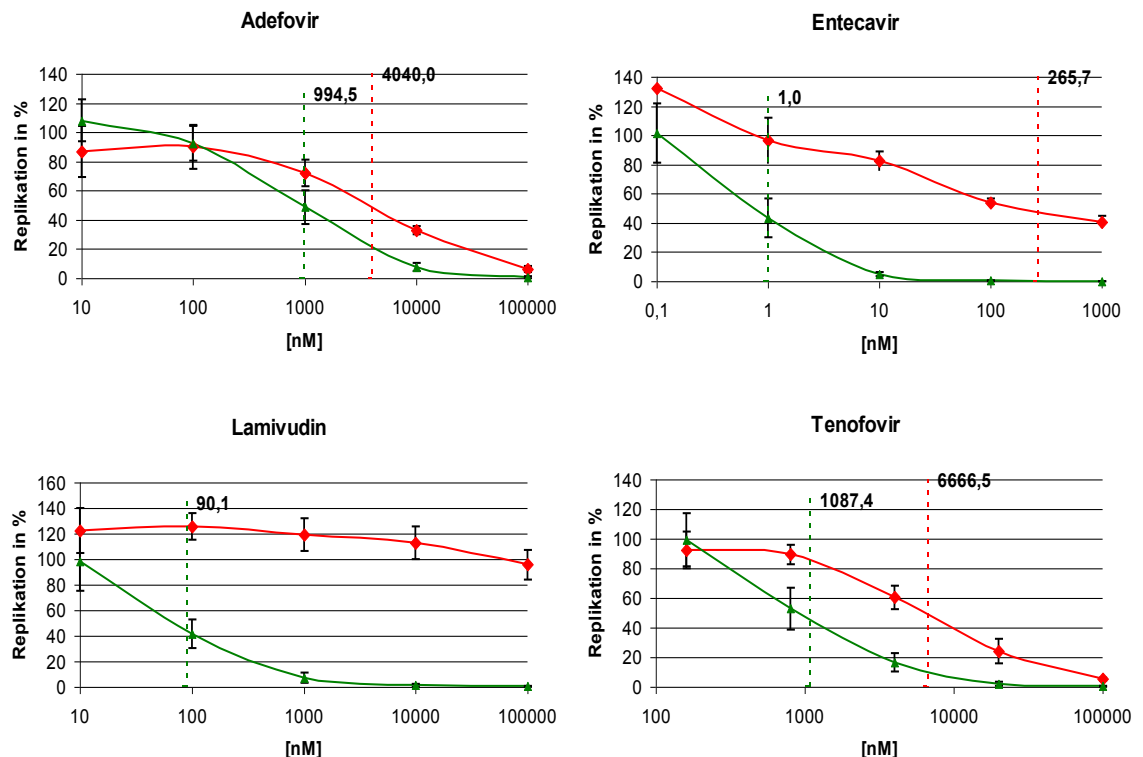


Abbildung 27: Resistenzprofil von P16 (173L,180M,204V)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P16 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.3.2.2 Isolate mit der Primärmutation rtM204I

Diese Mutation verursacht ähnliche Resistenzmuster wie die Primärmutation rtM204V (Ghany und Liang 2007). Sie ist weniger häufig mit rtL180M und dafür häufiger mit 80I/V assoziiert, weist aber generell die gleichen Sekundärmutationen auf, die bereits bei rtM204V erwähnt wurden (Warner et al. 2007). Insgesamt wurden 10 Patientenisolat untersucht, die eine solche Mutation aufweisen. Nur ein Isolat hatte keine Sekundärmutation, während die meisten Isolate eine Mutation an Position 80 aufwiesen. Zwei Isolate mit der Sekundärmutation rtL180M konnten ebenfalls gefunden werden. Die Daten dieser Gruppe sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Als typisches Beispiel ist P20 in Abbildung 28 aufgeführt.

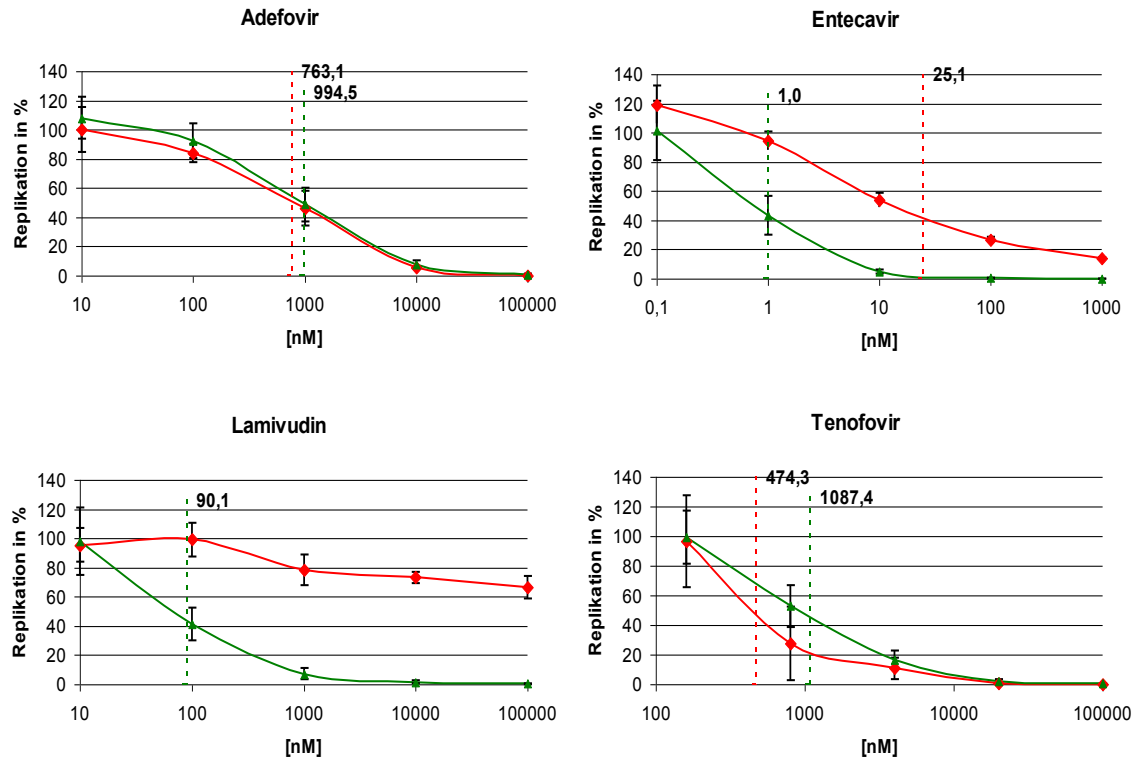


Abbildung 28: Resistenzprofil von P20 (80I,204I)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P20 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC_{50} an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

In Abbildung 28 lässt sich mit P20 ein typisches Resistenzprofil für rtM204I erkennen, mit keinerlei Resistenz gegen Adefovir oder Tenofovir bei einer mittleren Entecavir-Resistenz und einer sehr hohen Lamivudin-Resistenz.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Daten von P19 bis P28

Patientenisolat		Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
				ADV	ETV	LMV	TDF	
P19	RK-16-1	204I	A	1,5	5,6	>1110	0,6	5,7
P20	KW-WH2-34	80I,204I	D	0,8	24,9	>1110	0,4	79,8
P21	FvB-170-5	80I,204I	D	1,1	3,5	680,4	1,5	50,9
P22	FvB-158-1	80V,204I	D	1,6	11,5	>111	1,3	59,6
P23	FvB-175-14	80V,204I	D	2,2	76,1	>1110	1,0	47,6
P24	RK-16-3	80V,204I	A	0,8	4,2	>1110	1,5	4,5
P25	RK-44	173L,204I	D	4,2	220,6	>1110	2,4	20,3
P26	FvB-158-2	80V,173L,204I	D	0,8	130,5	>1110	1,4	91,6
P27	RK-190-1	80V,180M,204I	A	2,9	5,0	>1110	2,3	36,6
P28	RK-182-1	173L,180M,204I	G	2,7	24,1	>1110	3,4	24,8

Die Patientenisolats mit der Mutation rtM204I ergeben ein recht einheitliches Bild. Alle Varianten mit 80V/I und 204I sowie nur mit 204I haben keine signifikante Resistenz gegenüber Adefovir oder Tenofovir, eine mittlere Entecavir-Resistenz und eine hohe Lamivudin-Resistenz. Am stärksten schwanken dabei die Resistenzfaktoren gegenüber Entecavir. Sie liegen zwischen 3,5 und 76,1 im Vergleich zum Wildtyp.

Das Patientenisolat P25 zeigt neben einer sehr hohen Entecavir-Resistenz auch eine signifikante Adefovir-Resistenz. Bei dem Isolat P26, das neben den Mutationen von P25 zusätzlich noch 80V aufweist, sind die Resistenzen gegenüber Entecavir und Adefovir niedriger. Bei den Varianten P27 und P28, die beide die Mutation 180M besitzen, ist eine leichte Erhöhung der Adefovir- und Entecavir-Resistenzen feststellbar. Betrachtet man die Fitness der Isolate mit Genotyp D, so zeigt P25 die niedrigsten Werte und ist gleichzeitig das einzige Isolat, dem die Mutation an Stelle 80 fehlt. Aufgrund der signifikant erhöhten Adefovir-Resistenz und der verringerten Fitness ist P25 in Abbildung 29 dargestellt.

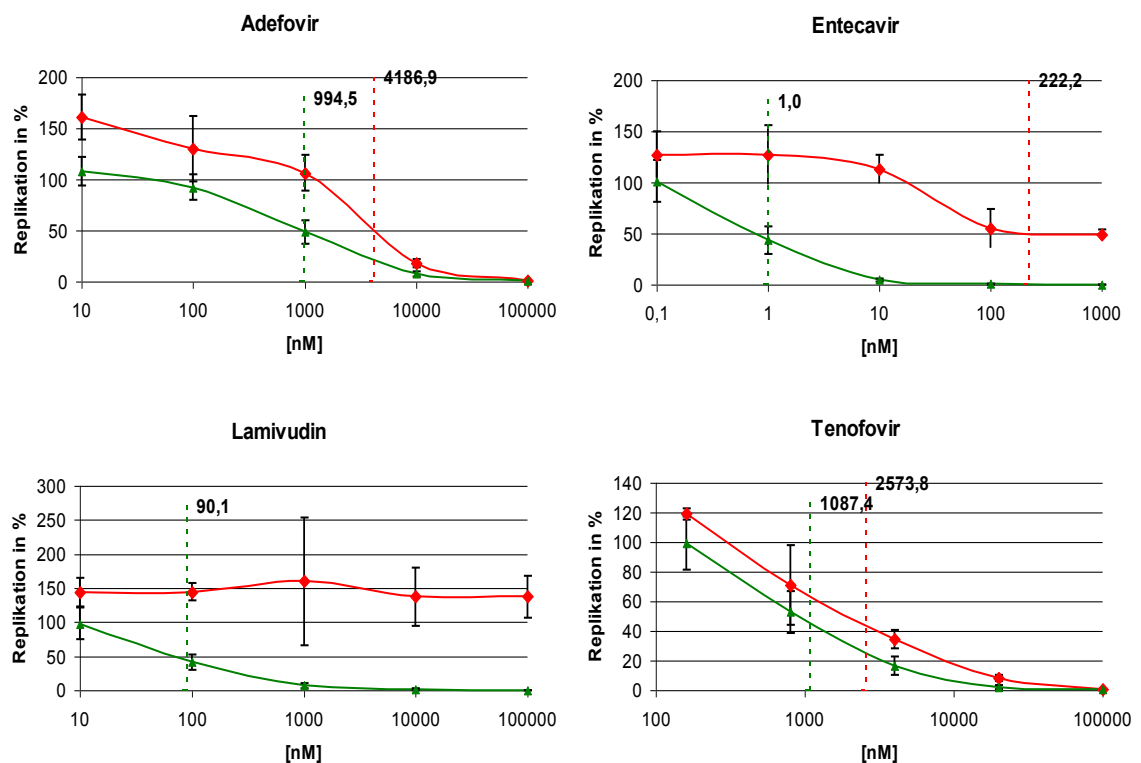


Abbildung 29: Resistenzprofil von P25 (173L,204I)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P25 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC_{50} an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.3.3 Patientenisolat mit Entecavir-Resistenzmustern

Nach bisherigen Erkenntnissen entwickelt sich eine Entecavir-Resistenz immer auf der Grundlage einer bereits bestehenden Resistenz durch die Mutationen L180M, M204V. Zu diesen Resistenzen muss mindestens eine weitere Resistenz an einer der Stellen 169, 184, 202 oder 250 hinzukommen um eine hohe Entecavir-Resistenz zu verursachen (Villet et al. 2007).

Das typische Entecavir-Resistenzmuster baut also auf einem bereits bestehenden Lamivudin-Resistenzmuster auf. Damit sollte jede Variante, die eine Resistenz gegen Entecavir aufweist auch gegen Lamivudin resistent sein. Insgesamt wurden 4 Patientenisolat getestet, die solche Resistenzmuster aufweisen. Die Daten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Daten von P29 bis P32

Patientenisolat		Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
				ADV	ETV	LMV	TDF	
P29	FvB-147-3	180M,184A,204V	D	1,1	528,0	1109,5	2,0	15,3
P30	WH-2-10-1	180M,202G,204V	D	7,0	992,8	1109,5	4,9	23,9
P31	FvB-155-1	173A,180M,184A,204V	D	2,3	398,1	111,0	5,1	17,4
P32	FvB-147-1	173A,180M,184A,204V	D	0,5	35,3	111,0	2,5	16,5

P29 zeigt mit nicht nachweisbarer Adefovir- und Tenofovir-Resistenz aber sehr hoher Entecavir- und Lamivudin-Resistenz das typische Resistenzprofil für diese Gruppe und ist in Abbildung 30 dargestellt. P31 und P32 haben ein ähnliches Mutationsmuster wie P29 mit der zusätzlichen Mutation V173A. Während P31 jedoch neben den hohen Entecavir- und Lamivudin-Resistenzen auch eine signifikante Tenofovir-Resistenz zeigt, ist bei P32 nur die Lamivudin-Resistenz stark ausgeprägt bei ungewöhnlich niedriger Entecavir-Resistenz. Damit zeigen diese beiden Isolate trotz gleicher Resistenzmutationen sehr große phänotypische Unterschiede.

Die höchsten Resistenzen zeigt die Variante P30 mit der Mutation 202G neben den grundlegenden Mutationen 180M und 204V. Hier lassen sich signifikante Resistenzen gegen alle Inhibitoren feststellen, sowie die höchsten Resistenzfaktoren in Bezug auf Entecavir. Das Resistenzprofil des Isolats ist in Abbildung 31 dargestellt. Alle vier Varianten haben in etwa die gleiche Fitness, die ca. 20% der Fitness des Wildtyps beträgt.

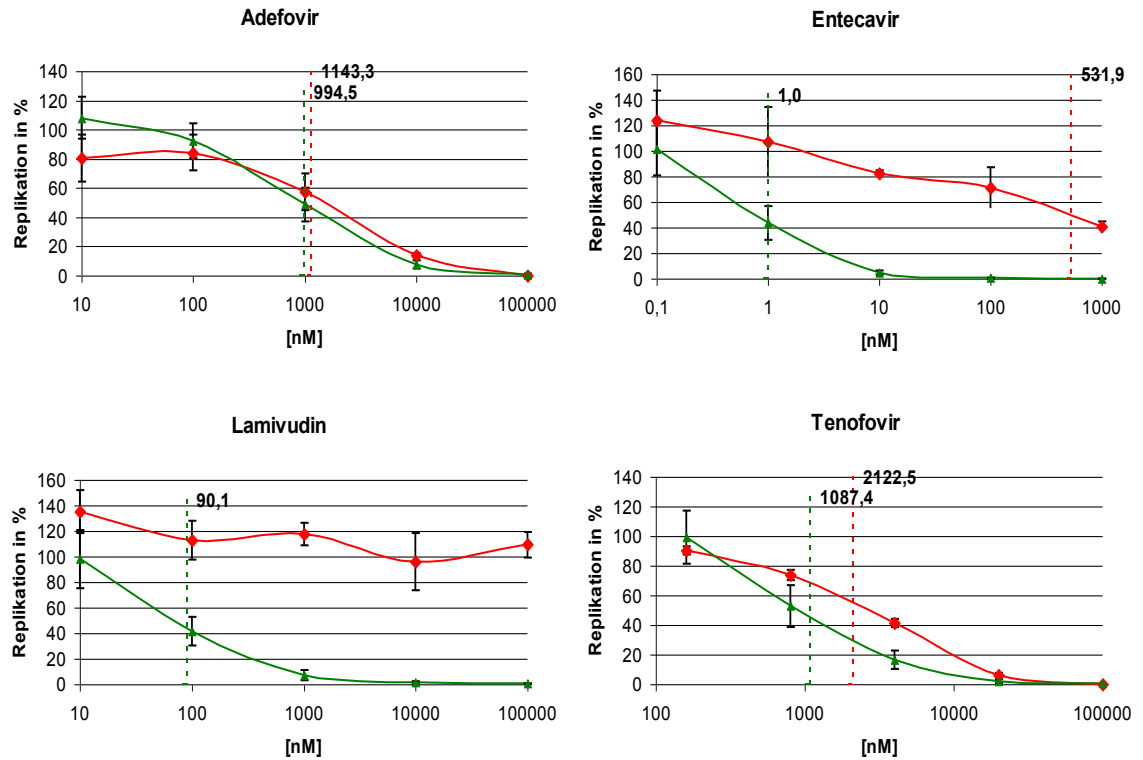


Abbildung 30: Resistenzprofil von P29 (180M,184A,204V)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P29 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden oben rechts.

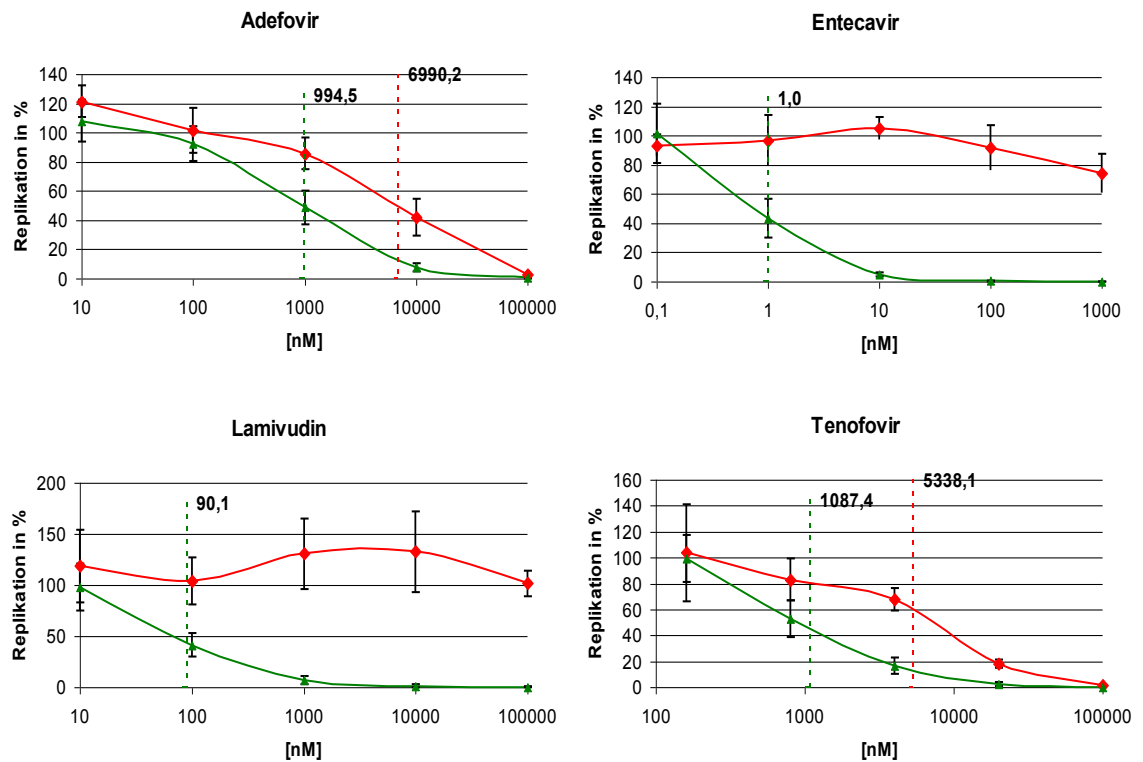


Abbildung 31: Resistenzprofil von P30 (180M,202G,204V)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P30 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.3.4 Patientenisolat mit Adefovir-Resistenzmutationen

Zwei Primärmutationen sind für die Resistenzentwicklung gegen Adefovir verantwortlich. Dabei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch an Position 181 (rtA181T/V) bzw. an Position 236 (rtN236T). Beide Mutationen können für sich allein eine klinisch relevante Adefovir-Resistenz auslösen, die sich noch erhöht wenn die Mutationen in Kombination vorkommen (Zoulim und Locarnini 2009). Die Mutationen an Stelle 181 verursachen als Primärmutation ebenfalls eine Resistenz gegen Lamivudin, wurden jedoch in die Adefovirgruppe eingeordnet, weil sie bei der Adefovir-Resistenz eine größere Bedeutung haben. Von den beiden erwähnten Mutationen ist ebenfalls eine Wirkung auf die Tenofovir-Resistenz festgestellt worden, welches sich nur durch eine Methylgruppe von Adefovir unterscheidet. Die Mutation rtI233V wurde ebenfalls mit Adefovir-Resistenz in Verbindung gebracht (Schildgen et al. 2006) und wird im Rahmen dieser Arbeit gesondert untersucht. Insgesamt wurden 10 Patientenisolat mit mindestens einer der erwähnten Mutationen untersucht. Sie sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Daten von P33 bis P42

Patientenisolat		Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
				ADV	ETV	LMV	TDF	
P33	FvB-164-7	181V	D	4,6	0,8	12,3	3,9	143,4
P34	FvB-172-5	181V	D	3,8	0,9	12,2	1,0	79,8
P35	RK-24	181V,215S	D	5,7	1,6	8,9	0,9	13,9
P36	FvB-172-4	181V	D	2,8	1,5	8,9	3,8	5,9
P37	RK-117-3	181V	A	4,1	0,6	9,5	4,7	35,4
P38	FvB-154-3	236T	A	11,1	0,5	1,2	3,1	59,4
P39	FvB-167-7	236T	A	9,8	0,7	1,5	7,0	17,8
P40	RK-162-1	181V,236T	D	13,4	1,1	37,4	11,6	62,0
P41	FvB-150-1-A	181V,236T	D	63,4	5,9	23,1	66,7	166,0
P42	FvB-150-1-B	181V,236T	D	166,9	28,5	455,6	37,7	110,8

Aus Tabelle 17 geht hervor, dass die Mutation 181V bei allen Patientenisolaten bis auf P36 eine signifikante Adefovir-Resistenz verursacht. Bei drei von fünf Isolaten ist ebenfalls eine signifikante Tenofovir-Resistenz feststellbar. Die Mutation scheint keinerlei Einfluss auf die Entecavir-Resistenz zu haben und die Lamivudin-Resistenz um etwa Faktor 10 zu erhöhen. P35 hat neben der Mutation 181V noch die Mutation 215S, welche eine Rolle bei der Adefovir-Resistenz spielen soll (Ghany und Liang 2007). Die Mutation N236T scheint einen stärkeren Effekt als 181T/V auf die Adefovir-Resistenz zu haben aber keinerlei Resistenz gegen Lamivudin oder Entecavir zu verursachen. Eine signifikante Tenofovir-Resistenz ist sowohl bei P38 als auch P39 zu erkennen. Die Isolate P37 und P38 sind als typische Beispiele der jeweiligen Primärmutation in Abbildung 32 zusammengefasst.

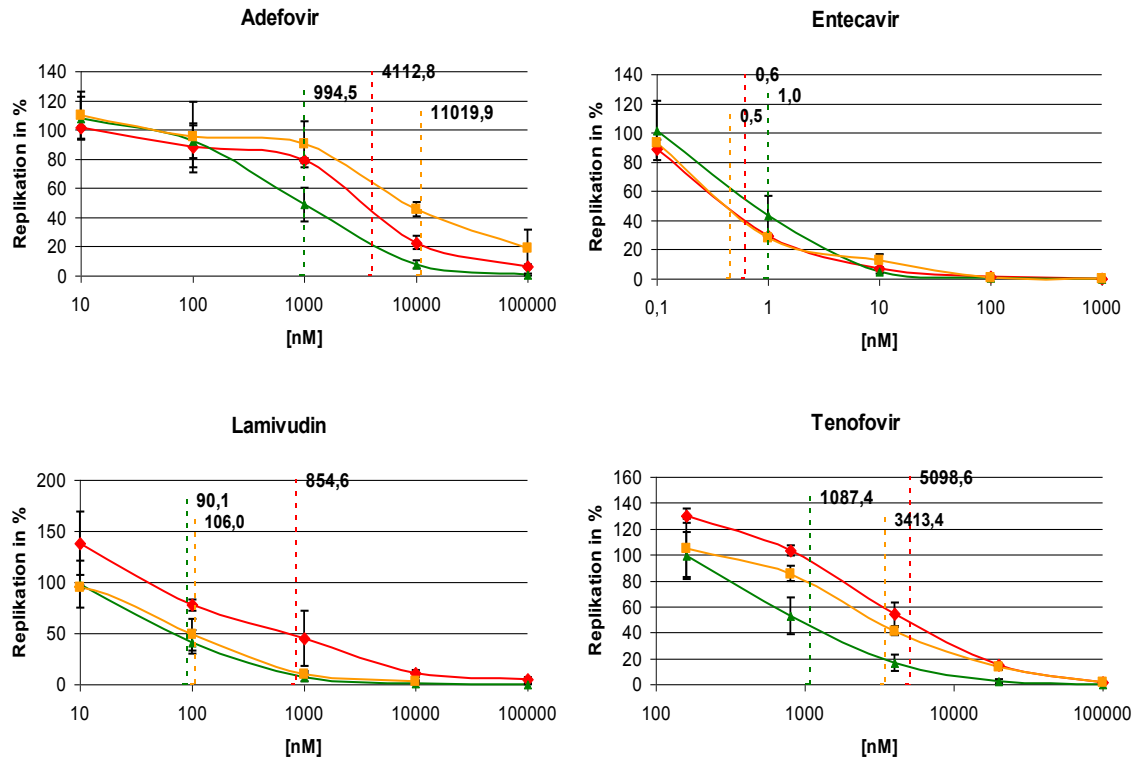


Abbildung 32: Resistenzprofile von P37 (181V, rot) und P38 (236T, orange)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P37 dar. Die orangen Linien sind die Resistenzkurven von P38. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

Durch P40 wird deutlich, dass die Kombination beider Mutationen sowohl die Resistenz gegen Adefovir als auch gegen Lamivudin und Tenofovir weiter erhöht aber keinen Effekt auf die Entecavir-Resistenz ausübt.

Die Fitnesswerte der verschiedenen Isolate sind sehr heterogen. Es lässt sich kein Zusammenhang der Fitness mit bestimmten Mutationen feststellen. Die Werte sind allgemein jedoch höher als bei anderen Mutationsmustern. Das Patientenisolat P40 ist als typisches Beispiel der Mutationskombination 181V,236T in Abbildung 33 dargestellt.

Einen Sonderfall stellt das Patientenisolat FvB-150-1 (P41 und P42) dar. Es zeigt extrem hohe Resistenzen gegen beide Nukleotidanaloge, sowie eine erhöhte Entecavir-Resistenz und eine mittlere Lamivudin-Resistenz. Die äußerst hohen Resistenzfaktoren gegen Adefovir und Tenofovir wurden zuvor noch nie bei einer Virusvariante festgestellt. Aufgrund des besonderen Phänotyps wurde der phänotypische Assay dieses Klon wiederholt (P41 und P42). Bei beiden phänotypischen Tests waren jedoch außergewöhnlich hohe Standardabweichungen feststellbar, wie in Abbildung 34 zu erkennen ist. Diese besondere Virusvariante wurde in der Masterarbeit von Pia Seiz (Seiz 2011) genauer untersucht und charakterisiert. Die hohen Resistenzen gegen die verschiedenen Inhibitoren ließen sich dabei reproduzieren.

Neben den hohen Resistenzfaktoren zeigt dieses Isolat bei beiden phänotypischen Tests eine leicht erhöhte Fitness im Vergleich zum Wildtyp.

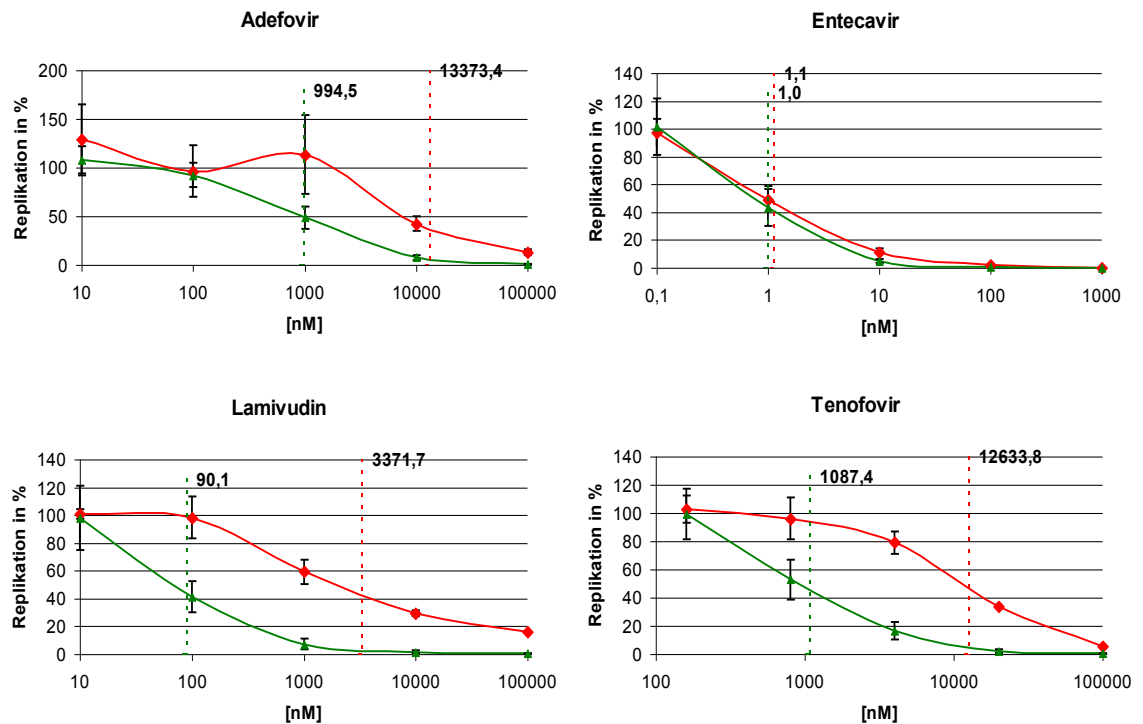


Abbildung 33: Resistenzprofil von P40 (181V,236T)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P40 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

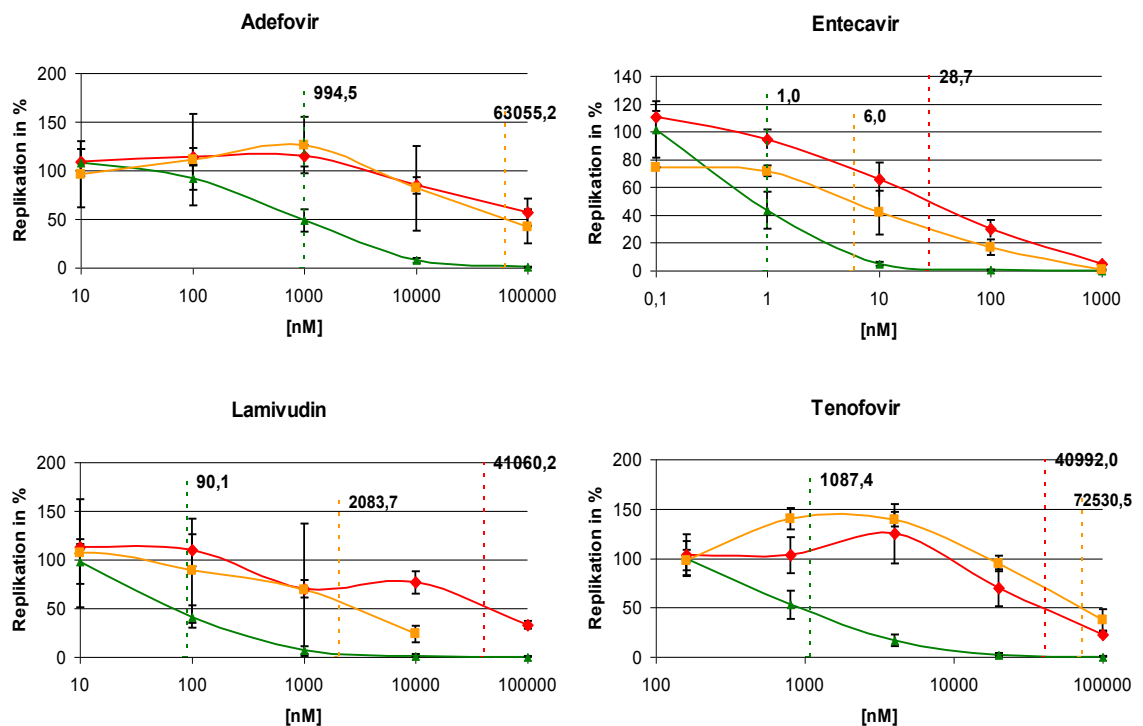


Abbildung 34: Resistenzprofile von Patientenisolat FvB150-1 (P41: orange, P42: rot)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P42 dar. Die orangenen Linien sind die Resistenzkurven von P41. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.3.5 Patientenisolat mit besonderen Kombinationen

Neben den bisher aufgeführten Patientenisolaten gab es noch zwei Varianten, die sich nicht in die Gruppen einfügen ließen. Die beiden Isolate zeigen mit rtM204V und rtL180M ein typisches Lamivudin-Resistenzmuster, haben aber zusätzlich noch die Adefovir-Resistenz-Primärmutation rtA181V. Sie stehen damit zwischen der Gruppe der Lamivudin-Resistenzvarianten und der Gruppe der Adefovir-Resistenzvarianten. Die Daten der beiden Isolate sind in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Daten von P43 und P44

Patientenisolat		Resistenz	GT	Resistenzfaktoren				Fitness in %
				ADV	ETV	LMV	TDF	
P43	FvB-164-1	180M,181V,204V	D	1,3	13,1	>1110	2,6	56,3
P44	FvB-166-1	180M,181V,204V	D	2,0	19,5	>1110	0,7	44,2

Die beiden Patientenisolat zeigen keinerlei signifikante Resistenzen gegen Adefovir oder Tenofovir trotz der Mutation 181V. Sie sind beide jedoch sehr resistent gegen Lamivudin und etwas resistent gegen Entecavir. Damit haben sie ein Resistenzprofil, das einer typischen Lamivudinresistenz stark ähnelt. Die Fitness der beiden Varianten ist ebenfalls recht ähnlich und mit etwa 50% nur geringfügig beeinträchtigt. Als Beispiel sind die Daten von P43 in Abbildung 35 gezeigt.

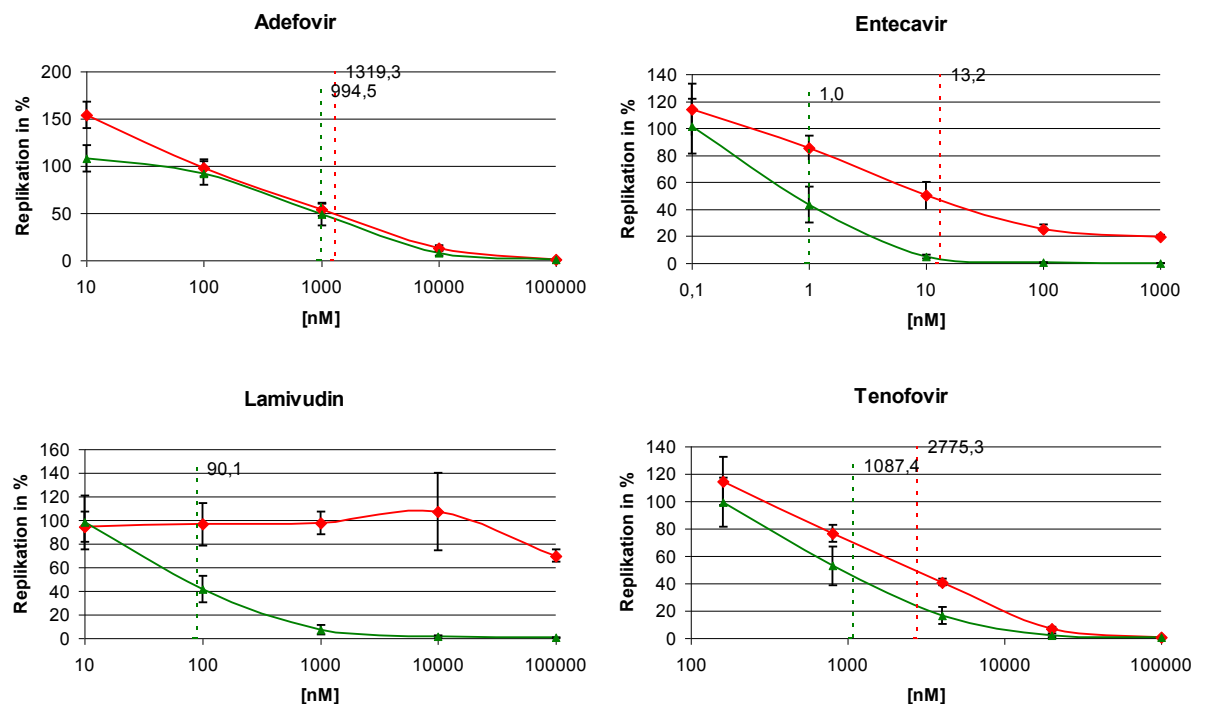


Abbildung 35: Resistenzprofil von P43 (180M,181V,204V)

Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Resistenzkurven von P42 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts.

4.4 Evaluierung des Fitnesstests anhand von Patientenisolaten

Nachdem die Resistenzen und Fitnesswerte der 44 Patientenisolats bestimmt wurden, wurden die phänotypischen Assays bei einigen zufällig ausgewählten Isolaten mit nicht inhibierten Wells wiederholt um herauszufinden, wie reproduzierbar die Fitnesswerte sind. Dabei wurden die absolut detektierten Konzentrationen an GE/ml im Überstand mittels HOPE-PCR detektiert und auf 100% Transfektionseffizienz normalisiert. Anschließend wurde mit dem jeweils parallel mitgelaufenen Wildtyp verglichen. In Abbildung 36 sind die so ermittelten Fitnesswerte relativ zum WT in % für die Wiederholer angegeben.

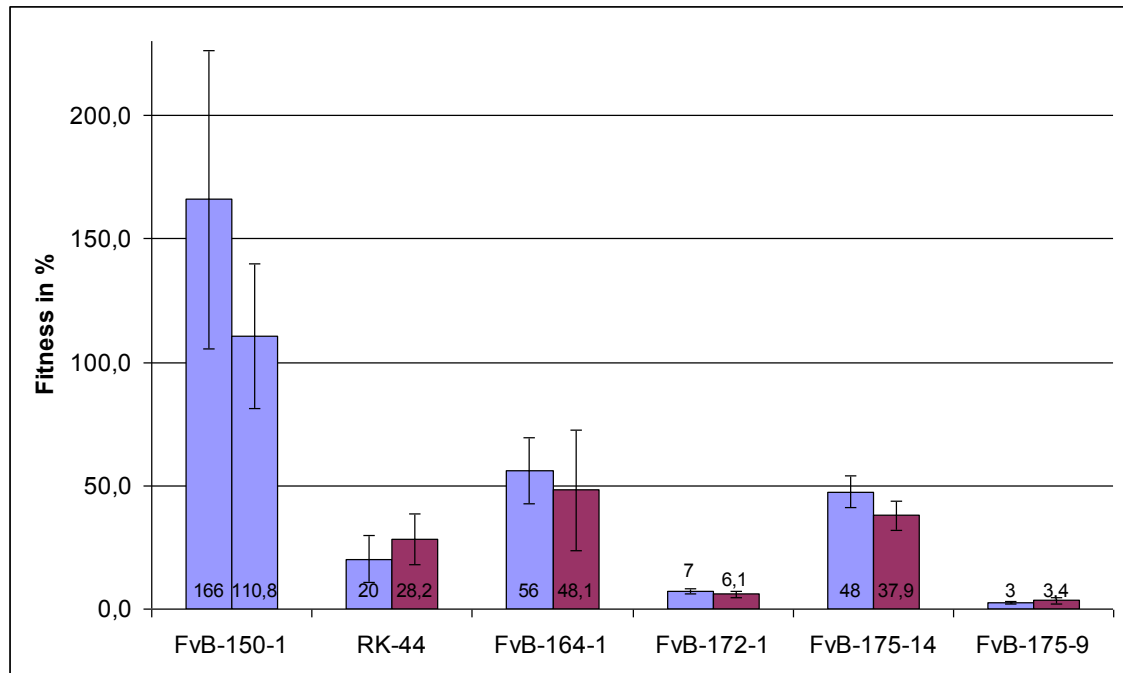


Abbildung 36: Fitnesswerte zufällig ausgewählter Patientenisolats

Die aus den phänotypischen Assays hervorgegangenen Fitnesswerte sind in blau dargestellt und beruhen auf 8 bis 12 Replikaten. Die ermittelten Fitnesswerte aus den Wiederholungen der jeweiligen Isolate sind lila dargestellt. Die Wiederholung der Fitnesswertermittlung beruht auf mindestens 3 (bis 9) Replikaten. Bei FvB-150-1 wurden die beiden Wiederholungen des Resistenzassays miteinander verglichen.

Tabelle 19: Übersicht der wiederholten Patientenisolats:

Patientenisolat		Resistenz	GT	Transfektionseffizienz in %	
				1.Versuch	2. Versuch
P14	FvB-175-9	173L,180M,204V	D	51,31	72,86
P16	FvB-172-1	173L,180M,204V	A	80,65	136,98
P23	FvB-175-14	80V,204I	D	79,54	117,96
P25	RK-44	173L,204I	D	110,15	40,40
P41/P42	FvB-150-1	181V,236T	D	134,39	179,27
P43	FvB-164-1	180M,181V,204V	D	83,93	128,59

In Abbildung 34 ist zu sehen, dass die Schwankungen der Fitnesswerte relativ gering sind. Das Patientenisolat FvB-150-1, welches auch bei den Resistenzkurven außergewöhnlich hohe Standardabweichungen zeigt, weist

auch hier die größten Schwankungen auf. Trotz hoher Unterschiede in den Transfektionseffizienzen (Tabelle 19) sind sich die errechneten normalisierten Fitnesswerte der beiden unabhängigen Versuche bei allen Isolaten relativ ähnlich.

4.5 Charakterisierung der Mutation *rtI233V*

Die Mutation *rtI233V* wurde mit einer primären Resistenz gegen Adefovir in Verbindung gebracht. Die entsprechende Mutation wurde durch Mutagenese in einen Wildtyp eingeführt und durch einen Resistenztest charakterisiert (Schildgen et al. 2006).

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Resistenztests wurden Patientenisolat aus den Originalseren der beschriebenen Patienten charakterisiert um den Einfluss der Mutation im ursprünglichen Sequenzumfeld evaluieren zu können. Von den Patienten wurden die Polymerase-ORFs wie in 3.2 beschrieben in den Vektor pCH9-3091 kloniert. Je 6 Klone pro Patient wurden mittels S6 antisense Primer sequenziert, um die Sequenzen im RT-Bereich des Polymerase-ORFs festzustellen. In Tabelle 20 sind die bekannten Resistenzen, die in den Klonen gefunden wurden gezeigt. Die Sequenzinformationen des Artikels über die Viren (aus Direktsequenzierungen der PCR-Produkte) vor und nach der Adefovirtherapie sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 20: gefundene Mutationen mittels Sequenzierungen der PCR-Amplifikate des Artikels bzw. von den in dieser Arbeit erstellten Klonen

Sequenzierung von	bekannte Resistenzen und <i>rtI233V</i>		
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Amplifikat vor ADF	I233V	M204I, I233V	V173L, M204I, I233V
Klon 1	I233V	I233V	V173L, M204I, I233V
Klon 2	I233V	I233V	V173L, M204I, I233V
Klon 3	I233V	I233V	V173L, M204I, I233V
Klon 4	I233V	L80I, M204I, I233V	V173L, M204I, I233V
Klon 5	I233V	I233V	L80V, M204I, I233V
Klon 6	I233V	I233V	L80V, L180M, M204I, I233V
Amplifikat nach ADF	I233V	I233V	M204I, I233V

Aus Tabelle 20 geht hervor, dass weder vor noch während oder nach der Adefovirtherapie eine bekannte Resistenzmutation bei Patient 1 gefunden werden konnte. Bei Patient 2 lag allerdings bereits vor der Therapie die Lamivudin-Resistenzmutation M204I vor. Durch die Sequenzierung der Klone konnte zusätzlich noch die Mutation 80I detektiert werden. Ob diese bereits vorher vorhanden war aber nicht detektiert wurde oder sich während der Therapie entwickelt hat ist unklar. Der Großteil der Klone von Patient 2 zeigt allerdings keine bekannten Mutationen. Bei Patient 3 wurden vor der Therapie zwei bekannte Lamivudin-Resistenzen gefunden. Durch die Klonierungen

wurden zwei weitere Lamivudin-Resistenzen detektiert. Nach der Adefovirtherapie schien nur noch die eigentliche Primärmutation gegen Lamivudin vorhanden zu sein. Alle Sequenzierungen zeigen ausnahmslos die Mutation rtI233V. Da der Klon 5 von Patient 2 die wenigsten Polymorphismen und keine bekannten Resistenzmutationen innerhalb des sequenzierten Bereichs aufweist (Analyse mittels Geno2pheno), wurde er für die phänotypischen Untersuchungen zwecks Charakterisierung von rtI233V verwendet.

Der phänotypische Assay wurde grundlegend wie bei den Patientenisolaten des HOPE-Projekts durchgeführt. Unterschiede bestanden in der verwendeten Zelllinie (HuH7 anstatt des Subklons HuH7-München) und in der Verwendung eigener Stammlösungen der 4 Nukleo(t)sidanaloga, die bei -20°C gelagert wurden. In zwei unabhängigen Versuchen wurde Klon 5 von Patient 2 jeweils mit dem Wildtypplasmid verglichen. Die Daten aus beiden Versuchen wurden zusammengefasst. Die so erstellten Mittelwerte basieren jeweils auf den Werten von sechs einzelnen Inhibitionskurven (2 unabhängige Versuche mit je 3fach Ansätzen). Das Resistenzprofil im Vergleich zum Wildtyp ist in Abbildung 37 dargestellt.

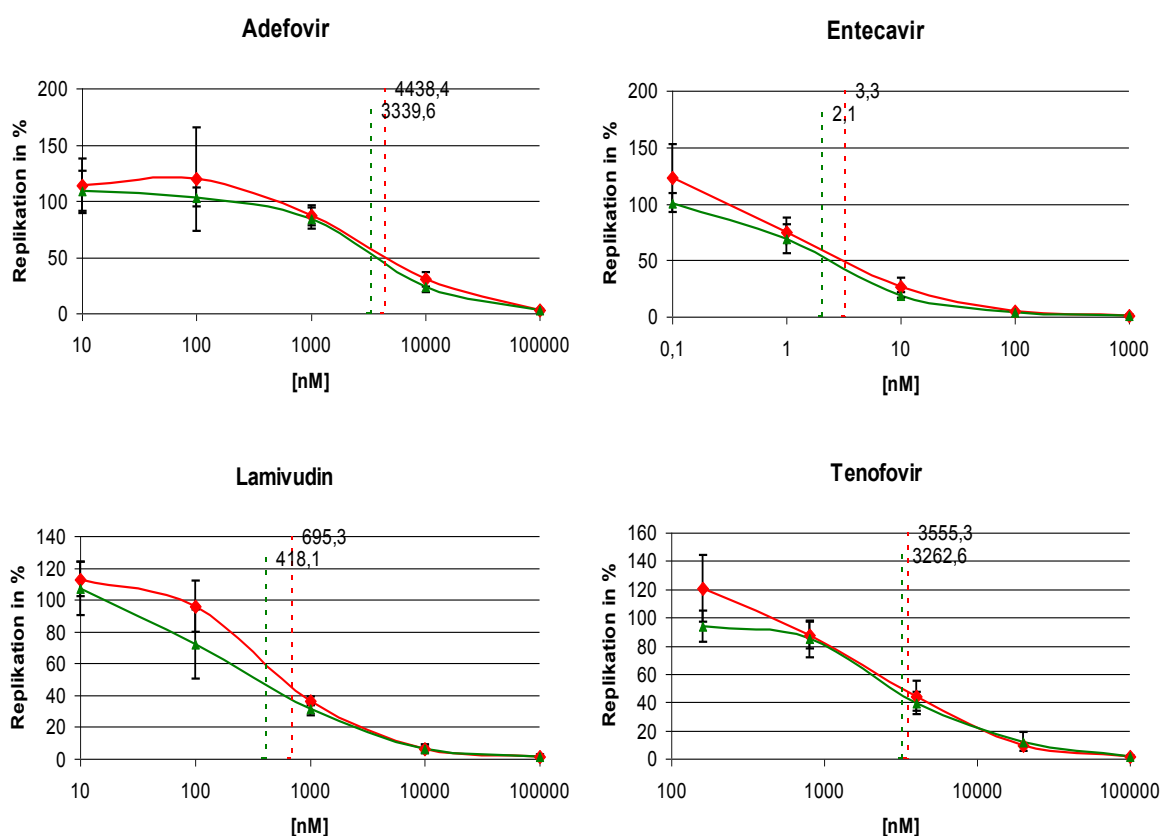


Abbildung 37: Resistenzprofil des Klons 5 von Patient 2 (rtI233V) im Vergleich zum parallel gelaufenen Wildtyp: Die grünen Linien stellen die Konsensuskurven des Wildtyps dar. Die roten Linien stellen die Konsensuskurven von Klon 5 dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Position der IC₅₀ an mit dem entsprechenden Wert oben rechts. Die Inhibitionskurven sind jeweils der Mittelwert aus 6 Einzelkurven. Die Fehlerbalken stellen die 95% Konfidenzintervalle der einzelnen Messpunkte dar.

Tabelle 21: IC₅₀-Werte des Wildtyps und des Klon 5 von Patient 2, sowie die Resistenzfaktoren relativ zum Wildtyp:

IC ₅₀ in nM	ADF	ETV	LMV	TDF
Wildtyp	3339,6	2,1	418,1	3262,6
Klon 5 Patient 2	4438,4	3,3	695,3	3555,3
Resistenzfaktoren	1,3	1,6	1,7	1,1

Die ermittelten Resistenzfaktoren, sowie die ermittelten IC₅₀ Werte sind in Tabelle 21 gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass keine signifikante Resistenz für den Klon mit der Mutation rti233V festgestellt werden konnte. Alle ermittelten Resistenzfaktoren liegen unter 2 und liegen somit eindeutig innerhalb der Messungenauigkeit. Das gleiche Bild ergibt sich auch aus der Grafik der Inhibitionskurven aus den zusammengefassten Werten, die in Abbildung 36 mit 95% Konfidenzintervallen gezeigt sind.

In Abbildung 37 ist klar zu erkennen, dass die Kurven des Wildtyps und der zu testenden Variante sehr ähnlich verlaufen. Die errechneten 95% Konfidenzintervalle überschneiden sich bei jedem gemessenen Punkt.

Ein Einfluss der Mutation rti233V auf die Resistenz gegen die getesteten Nukleos(t)idanaloga kann mit dem verwendeten Test nicht bestätigt werden.

4.6 Untersuchung neuer RT-Inhibitoren

Neben der Phänotypisierung von Patientenisolaten und der Charakterisierung einzelner Mutationen bietet sich der entwickelte Resistenztest ebenso dafür an, neue Inhibitoren der reversen Transkriptase bezüglich ihrer in vitro Wirksamkeit zu testen.

Herr PD Dr. E. Matthes (Berlin, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin) stellte die vier Inhibitoren L-Hyd4C, L-Hyd4FC, L-Hy2'Fd4C und L-Hy2'Fd4FC zur Verfügung, um deren in vitro Wirksamkeit in dem hier entwickelten Test direkt mit den zugelassenen Mitteln zu vergleichen. Bei den vier zu testenden Inhibitoren handelt es sich um Cytidinderivate. Sie ähneln somit dem Inhibitor Lamivudin. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich eine Kreuzresistenz zwischen Lamivudin-Resistenzvarianten und den vier Inhibitoren vermuten, weshalb sie parallel zum Wildtyp (pCH9-3091) auch mit einer bekannten Lamivudin-Resistenzvariante getestet wurden. Die Resistenzvariante enthält die Mutationen rtiL180M und rtiM204V und geht aus dem Plasmid pCH9-3091 hervor. Sie wurde von der AG Protzer zur Verfügung gestellt. Die Strukturformel von L-Hyd4C ist in Abbildung 38 im Vergleich zu den Strukturformeln von Lamivudin und Cytidin gezeigt. Für L-Hyd4C wurde bereits eine hohe Wirksamkeit bei geringer Cytotoxizität in vitro mit HepG2.2.15-Zellen (HBV-produzierende stabil transfizierte HepG2-Zellen) nachgewiesen (Matthes et al. 2007) und für die Variante L-Hyd4FC konnte eine dem Lamivudin überlegene in vivo Wirkung mit immunsupprimierten Mäusen gezeigt werden

(Matthes et al. 2010). Über Hy2'Fd4C und L-Hy2'Fd4FC waren noch keine Daten bekannt.

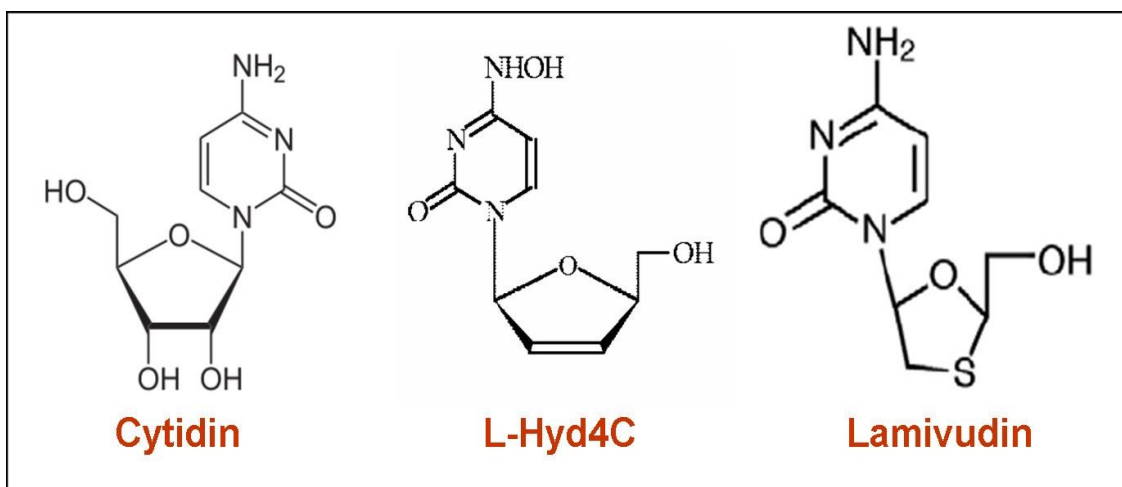


Abbildung 38: Das natürlich vorkommende Nukleosid Cytidin und dessen Derivate L-Hyd4C und Lamivudin (modifiziert nach Ghany und Liang 2007 und Matthes et al. 2007)

Der phänotypische Test wurde prinzipiell wie in 3.2 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde die Zelllinie HuH7 verwendet (anstatt HuH7-München), sowie die Plasmidstocks aus den Versuchen von 4.5. Neben Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir wurden auch die vier neuen Inhibitoren in den Test eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen sind in Abbildung 39 und 40 gezeigt. Für den Wildtyp wurden zwei unabhängige Versuche mit jeweils dreifach Ansätzen durchgeführt. Die so generierten Daten aus sechs Inhibitionskurven wurden zusammengefasst. Aus diesem Datensatz wurden anschließend die IC_{50} -Werte berechnet. Für die phänotypische Untersuchung mit der Lamivudin-Resistenzvariante wurde nur ein Versuch mit Dreifach ansätzen durchgeführt. Die ermittelten IC_{50} für die Mutante wurden berechnet und mit den Wildtypwerten verglichen um die Resistenzfaktoren zu bestimmen. Die Daten aus den Versuchen sind in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: IC_{50} -Werte und Resistenzfaktoren für Wildtyp und Mutante bezüglich der 8 getesteten Inhibitoren

Inhibitor	IC_{50}		Resistenzfaktor Mutante
	Wildtyp	Mutante	
Adefovir	4002,9	6250,3	1,6
Entecavir	2,1	217,5	105,3
Lamivudin	418,1	>100000,0	>239
Tenofovir	3262,6	2385,6	0,7
L-Hyd4C	641,1	>10000	>15,6
L-Hyd4FC	1957,5	>100000	>51,1
L-Hy2'Fd4C	~35503,9	>100000	(>2,8)
L-Hy2'Fd4FC	>100000	>100000	-

Die ermittelten IC₅₀-Werte des Wildtyps für Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir entsprechen den bereits ermittelten Werten aus 4.5. Die Resistenzfaktoren der Mutante zeigen die typische hohe Lamivudin-Resistenz bei mittlerer Entecavir-Resistenz und keiner nachweisbaren Resistenz gegenüber Adefovir oder Tenofovir.

Die Wirkung von L-Hyd4C ist mit der von Lamivudin vergleichbar während L-Hyd4FC etwa um den Faktor 3 weniger wirksam ist. Die IC₅₀ von L-Hy2'Fd4C ist nur grob bestimmbar, da sie sich am Rande des Messbereichs und damit der Wirksamkeit befindet. Der Resistenzfaktor für die Mutante ist deshalb auch nicht sinnvoll bestimmbar. Er ist in Klammern in Tabelle 22 angegeben. Der Inhibitor L-Hy2'Fd4FC zeigt beim Wildtyp keinen inhibitorischen Effekt innerhalb des Messbereichs. Eine Inhibition der Replikation bezüglich der Mutante war bei keinem der zu testenden neuen Inhibitoren feststellbar. Dabei war selbst bei der jeweils höchsten eingesetzten Inhibitorkonzentration keinerlei Wirkung der Mittel zu erkennen (Abbildung 40).

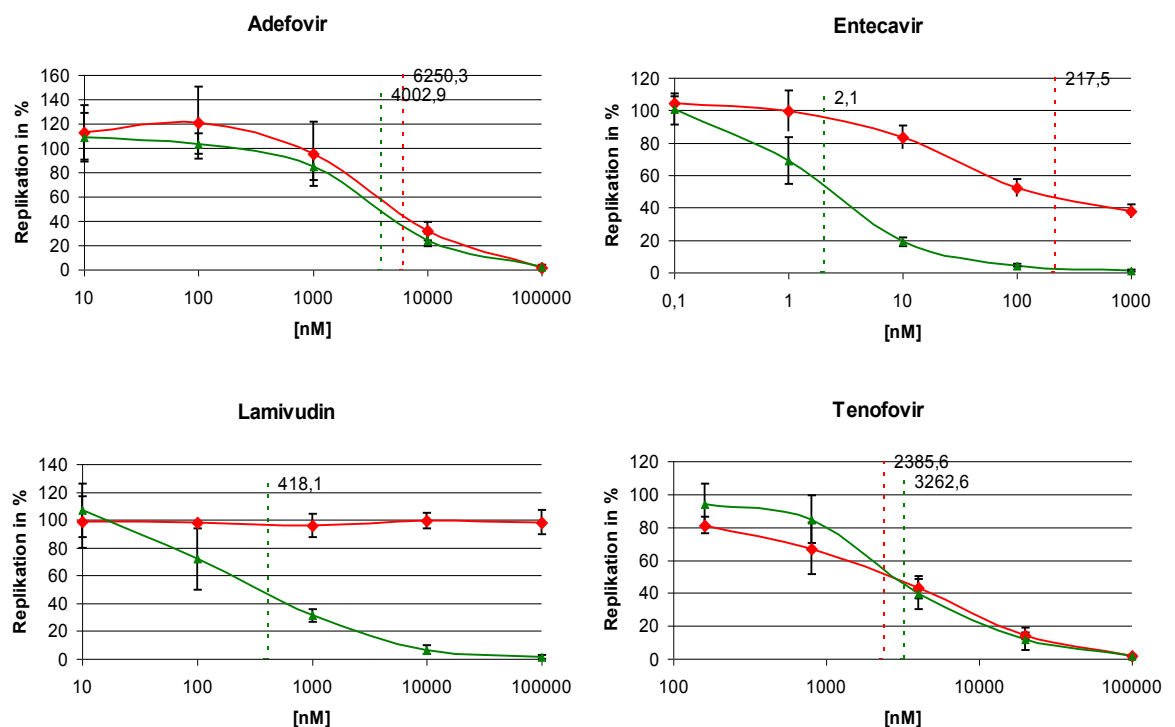


Abbildung 39: Resistenzprofile des Wildtyps (grün) und der Mutante (180M,204V, rot) bezüglich der klinisch relevanten RT-Inhibitoren

Die Wildtypwerte sind jeweils der Mittelwert aus 6 Inhibitorskurven mit Standardabweichung. Die Werte der Mutante sind der Mittelwert aus 3 Inhibitorskurven mit Standardabweichung.

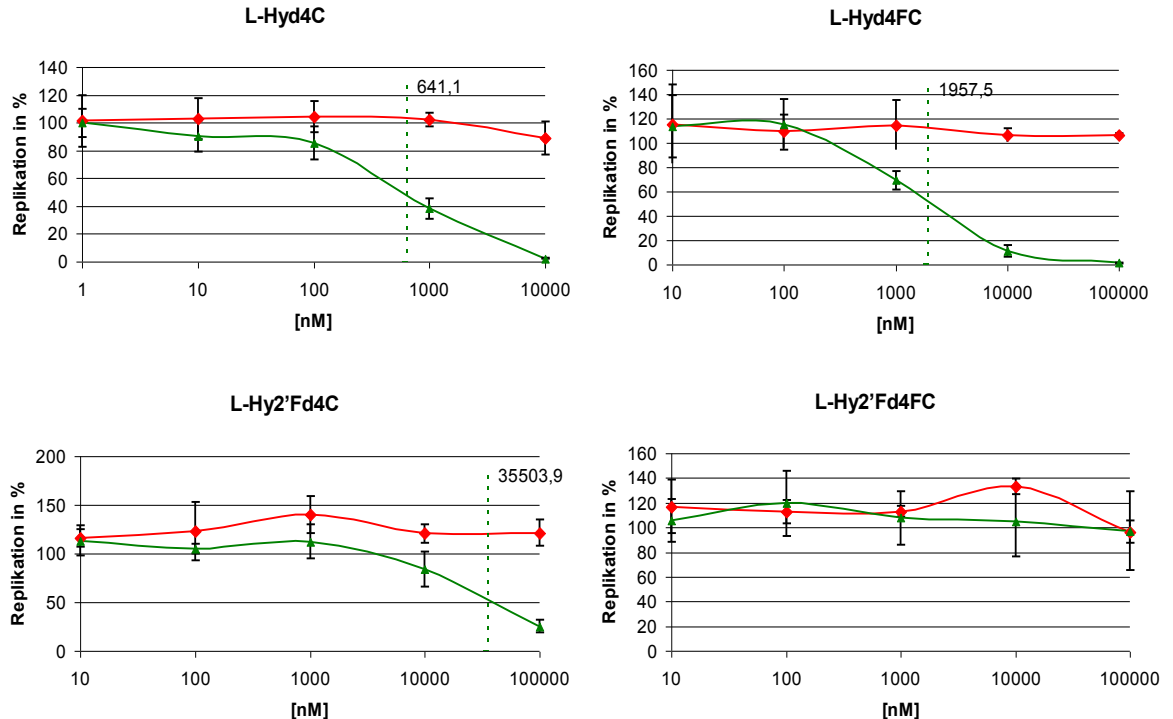


Abbildung 40: Resistenzprofile des Wildtyps (grün) und der Mutante (180M,204V, rot) bezüglich der neuen getesteten Inhibitoren

Die Wildtypwerte sind jeweils der Mittelwert aus 6 Inhibitorskurven mit Standardabweichung. Die Werte der Mutante sind der Mittelwert aus 3 Inhibitorskurven mit Standardabweichung.

4.7 Erstellung stabiler Linien mit dem Vektor pCEP-Puro

Um eine bestimmte HBV-Variante näher charakterisieren zu können werden meist größere Mengen an viralen Proteinen und Viren benötigt. Hierzu sind stabil transfizierte Linien geeigneter. Diese Zelllinien zu generieren ist jedoch meist recht aufwendig und langwierig, da sie das entsprechende Konstrukt in das Genom stabil integrieren müssen. Eine einfachere und schnellere Alternative stellt die Transfektion eines episomal stabilen Konstrukts dar, welches sich in eukaryotischen Zellen vermehren kann. Das Plasmid pCEP4 bietet mit dem EBNA-1-ORF und dem Ori-P des Epstein Barr Virus diese Möglichkeit. Um die Selektion transfizierter Zellen beschleunigen zu können, wurde die Puromycin-Resistenzkassette in den Vektor eingebaut.

Mit Hilfe der ligations- und restriktionsunabhängigen In-Fusion Klonierung war es möglich aus dem bei Invitrogen erhältlichen Vektor pCEP4 den Vektor pCEP-Puro herzustellen. Dazu wurde die Hygromycin-Resistenz des Vektors pCEP4 mittels In-Fusion-Klonierung durch die Puromycin-Resistenzkassette von pPur ersetzt (siehe 3.7.1 und 2.5). Der neu erstellte Vektor vermehrt sich in eukaryotischen Zellen und verbleibt dabei in episomaler Form. Die transfizierten Zellen lassen sich mit Puromycin schnell und effizient selektieren.

4.7.1 Erstellung stabiler Linien mit pCEP-Puro-Cherry

Zur Etablierung und Funktionstestung wurde auf der Grundlage von pCEP-Puro ebenfalls durch In-Fusion Klonierung der Vektor pCEP-Puro-Cherry hergestellt, welcher den ORF für das rot fluoreszierende Protein mCherry enthält. HuH7-Zellen wurden mit pCEP-Puro-Cherry transfiziert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit 3 µg/ml Puromycin selektiert (siehe 3.8.4). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte HuH7-Zellen, sowie HuH7-Zellen, die mit pCEP-Puro (Leervektor ohne mCherry ORF) transfiziert wurden. In Abbildung 41 sind lichtmikroskopische, sowie UV-Aufnahmen der Zellen gezeigt.

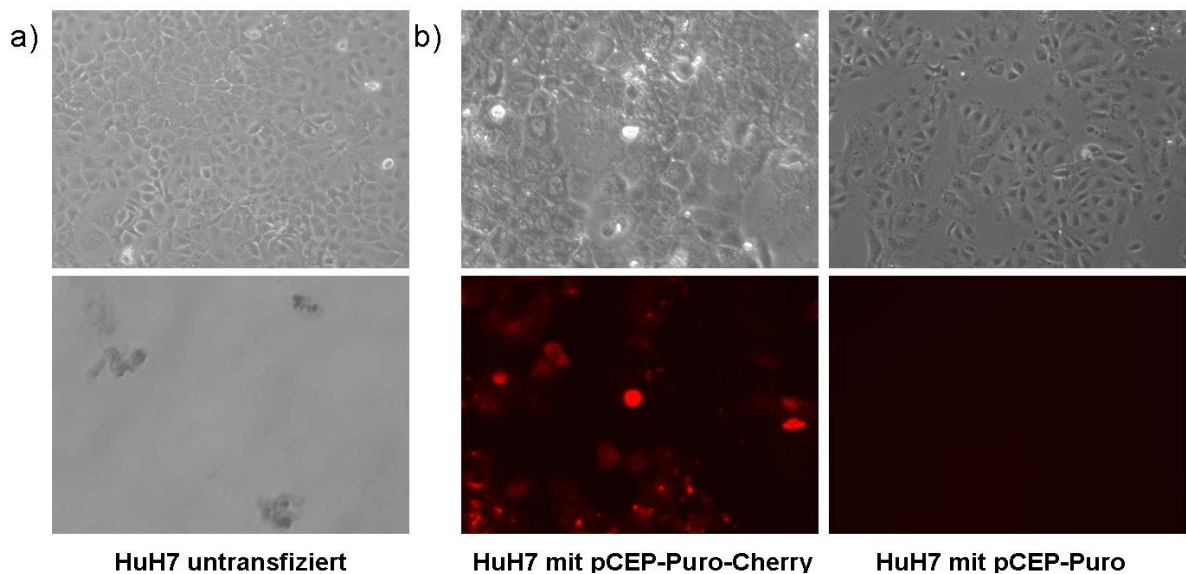
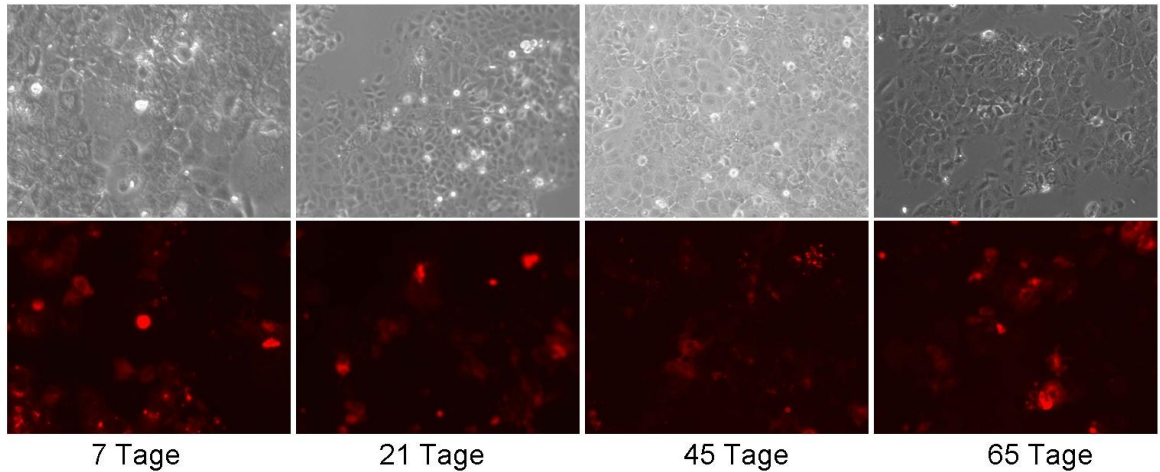


Abbildung 41: Mikroskopische Aufnahmen der transfizierten HuH7 Zellen nach 7 Tagen Selektion

a) Lichtmikroskopische Aufnahmen nicht transfizierter Zellen nach 7 Tagen unter Puromycinselektion (unten) oder ohne Puromycinselektion (oben) **b)** Lichtmikroskopische Aufnahmen (oben) und UV-Aufnahmen (unten, je 15 sek Belichtungszeit) der beiden transfizierten Zellkulturen nach 7 Tagen Puromycinselektion

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass bei Kultivierung der untransfizierten Zellen mit Puromycin nach 7 Tagen keine lebenden Zellen mehr vorhanden sind. Nur noch einige Zellreste sind zu erkennen. Zellen die entweder mit pCEP-Puro oder mit pCEP-Puro-Cherry transfiziert wurden, zeigen bei gleicher Behandlung nach 7 Tagen eine beinahe konfluente Zellschicht. Die mit pCEP-Puro-Cherry transfizierten Zellen zeigen zu etwa 50% ein starkes Signal unter UV-Anregung, während die mit pCEP-Puro transfizierten Zellen keinerlei Signal erkennen lassen.

HuH7-Zellen



HepG2-Zellen

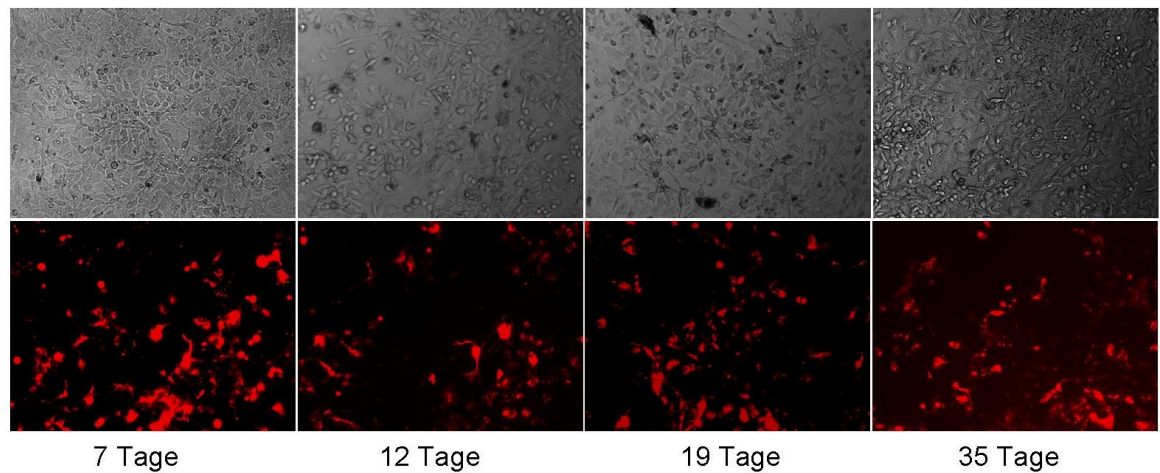


Abbildung 42: Beobachtung der mit pCEP-Puro-Cherry transfizierten Hepatomzelllinien unter Puromycinselektion über mehrere Wochen

Lichtmikroskopische und UV-Aufnahmen der mit pCEP-Puro-Cherry transfizierten und selektierten HuH7- und HepG2-Zellen. Die Belichtungszeit bei den UV-Aufnahmen betrug bei den HuH7-Zellen jeweils 15 Sekunden und bei den HepG2-Zellen jeweils 10 Sekunden.

Um die Stabilität der Transfektion untersuchen zu können, wurden die selektierten Zellen mit pCEP-Puro-Cherry über einen Zeitraum von mehreren Wochen kultiviert und regelmäßig mikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden dabei wöchentlich zweimal passagiert und dabei 1 zu 10 gesplittet. Neben den HuH7-Zellen wurden auch HepG2-Zellen mit pCEP-Puro-Cherry transfiziert und ebenfalls über einen längeren Zeitraum beobachtet. Sie wurden zweimal wöchentlich passagiert und dabei 1 zu 5 gesplittet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt.

Sowohl bei den HuH7-Zellen als auch bei den HepG2-Zellen ist über den jeweils beobachteten Zeitraum (9 Wochen bzw. 5 Wochen) keine Veränderung des Anteils an leuchtenden Zellen zu erkennen. Die Intensität des Signals unterscheidet sich stark zwischen den einzelnen Zellen einer Zellkultur. Trotz kürzerer Belichtungszeit ist das Signal bei den HepG2-Zellen stärker als bei den HuH7-Zellen.

4.7.2 Erstellung einer stabilen HBV-produzierenden Hepatom-Zelllinie mit Hilfe eines episomalen Expressionskonstrukts

Auf Grundlage des Vektors pCEP-Puro wurde der Vektor pCEP-Puro-3091 hergestellt, welcher das HBV-Überlängenkonstrukt aus dem Plasmid pCH-9-3091 enthält. Um festzustellen, ob der Vektor nach der Transfektion von HuH7-Zellen zur Produktion neuer Viren führt, wurde ein phänotypischer Test mit Adefovir durchgeführt (Abbildung 43).

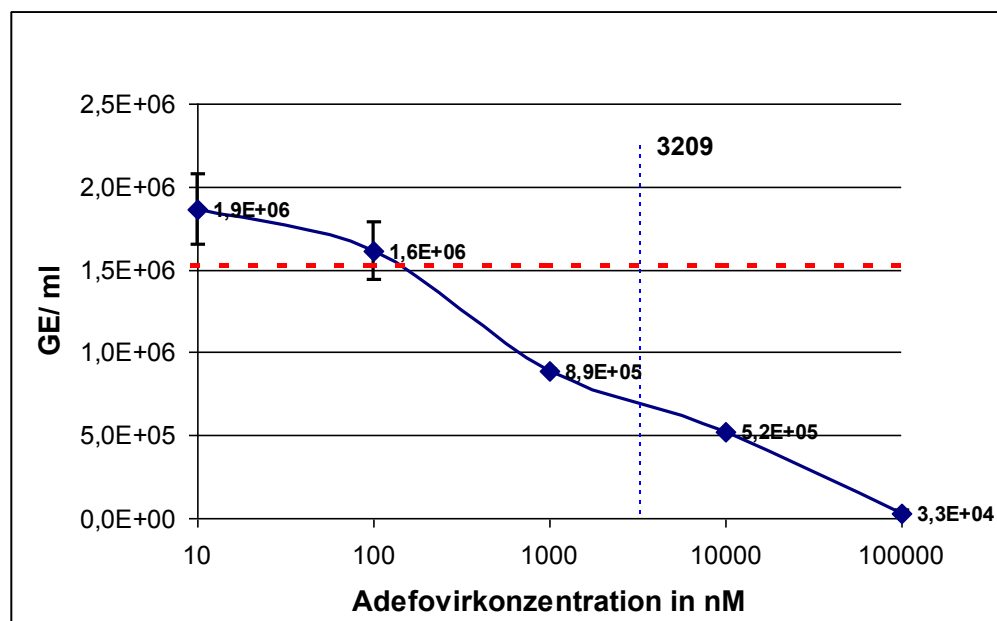


Abbildung 43: Adefovirinhibitionskurve der transfizierten HuH7-Zellen

Die gestrichelte vertikale Linie zeigt die errechnete IC_{50} an. Die horizontale gestrichelte Linie zeigt die GE/ml im Überstand der nicht inhibierten Zellen an. Die Werte sind jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus Doppelansätzen und rechts neben den Datenpunkten angezeigt.

Nach der transienten Transfektion und Inkubation für 3 Tage (siehe 3.11.1) sind bei den nicht inhibierten Zellen etwa $1,55 \times 10^6$ GE/ml im Überstand nachweisbar. Dies entspricht in etwa den detektierten Mengen nach Transfektion mit pCH9-3091. Die ermittelte IC_{50} für Adefovir entspricht in etwa den bereits ermittelten IC_{50} aus 4.5 und 4.6.

Nachdem die HBV-Produktion des Vektors nachgewiesen werden konnte, wurde nun die Stabilität der Transfektion untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen für 26 Tage unter Puromycinselektion kultiviert und dabei bis zu Tag 15 insgesamt viermal passagiert (jeweils 1 zu 5 gesplittet). An Tag 13 und 14 wurden die Zellen unter 1000 nM Entecavir kultiviert. An Tag 15 wurden die Zellen abtrypsiniert, drei mal gewaschen und auf zwei neue Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt. Die Zellen der einen Schale wurden mit 1000 nM Entecavir in 10% FKS DMEM kultiviert und dienten als Negativkontrolle, während die anderen Zellen ohne Entecavir kultiviert wurden. Beide Ansätze wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. Es wurden regelmäßig je 200 µl Überstand entnommen und durch das

entsprechende Medium ersetzt. An Tag 21 wurden nach der Abnahme der Überstände die Zellen jeweils 1 zu 5 gesplittet und in neuem Medium weiterkultiviert. Die Überstände wurden aufgereinigt und in eine HOPE-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

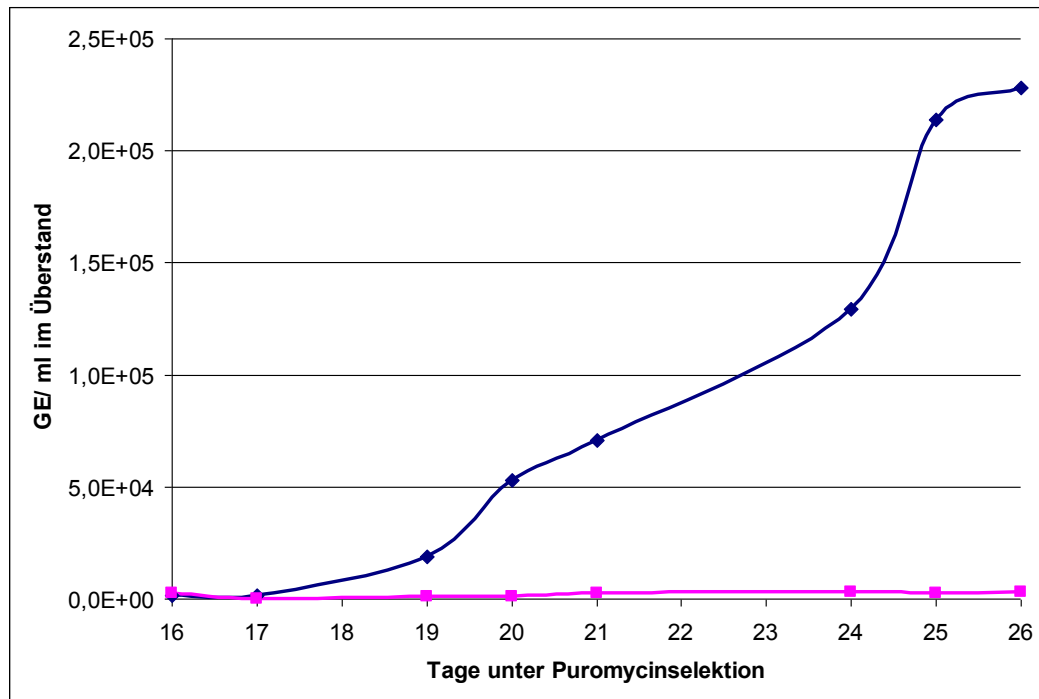


Abbildung 44: Menge an detektierten HBV-Genomen im Überstand der stabil transfizierten Zellen

Nach 2 Tagen Vorinkubation unter 1000 nM Entecavir wurden die Zellen gewaschen und entweder mit 1000 nM Entecavir (rosa) oder ohne Entecavir (blau) kultiviert. An Tag 5 wurden die Zellen auf neue Kulturschalen mit neuem Medium 1 zu 5 gesplittet. Die Messung der Virusmenge im Überstand wurde an den Tagen 16,17,19,20,21,24,25 und 26 ermittelt.

Bei den nicht inhibierten Zellen steigt die Menge an Viren im Überstand von Tag 16 bis Tag 25 stark an. Von Tag 25 auf Tag 26 lässt sich keine deutliche Erhöhung der Virusmenge mehr feststellen. Die Menge an detektierten Genomen liegt am Ende bei etwa 2×10^5 GE/ml. Dies entspricht etwa einem Zehntel der detektierten Viren nach der transienten Transfektion. Bei den Zellen die mit 1000 nM Entecavir inhibiert wurden ist kein Anstieg der Virusmengen über den gesamten Zeitraum zu erkennen.

4.8 Erstellung eines Überlängenkonstrukts ohne Vektorkassette

Mit Hilfe der In Fusion-Klonierung wurde aus dem klonierten HBV-Genom eines Patientenserums ein replikationsfähiges Überlängenkonstrukt hergestellt (siehe 3.7.2). Bei dieser Methode wurde keine Vektorkassette (z. B. pCH9-3091) für die Erzeugung des Überlängenkonstrukts benötigt. Die einzelnen Schritte der Klonierung sind in Abbildung 45 schematisch dargestellt.

Hier ist zu sehen, dass allein die isolierte DNA des HBV-Genoms aus den Virionen des Patientenserums für die Herstellung des Überlängenkonstrukts verwendet wurde. Die beiden PCRs für die Herstellung der Fragmente

beinhalten jeweils den Bereich der zuvor ligierten Enden des HBV-Genoms (Abbildung 45.3 schwarz). Das 5'-Ende des linken Amplifikats (grün, Abbildung 45) ist dabei im Bereich von 15 Basenpaaren homolog zum 3'-Ende des Vektors und das 3'-Ende des linken Amplifikats ist homolog zum 5'-Ende des rechten Amplifikats (gelb Abbildung 45). Das 3'-Ende des rechten Amplifikats ist homolog zum 5'-Ende des Vektors. Aufgrund dieser Homologien werden die beiden Fragmente bei der ligationsunabhängigen Klonierungsmethode in der richtigen Reihenfolge und Orientierung in den Vektor eingebaut. Zusammen bilden sie das Überlängenkonstrukt, welches kurz vor der ursprünglichen Ligationsstelle beginnt und etwa 200 bp nach der Ligationsstelle endet. Dieser Bereich umfasst dabei die minimal ausreichende Sequenz zur Transkription der prägenomischen mRNA.

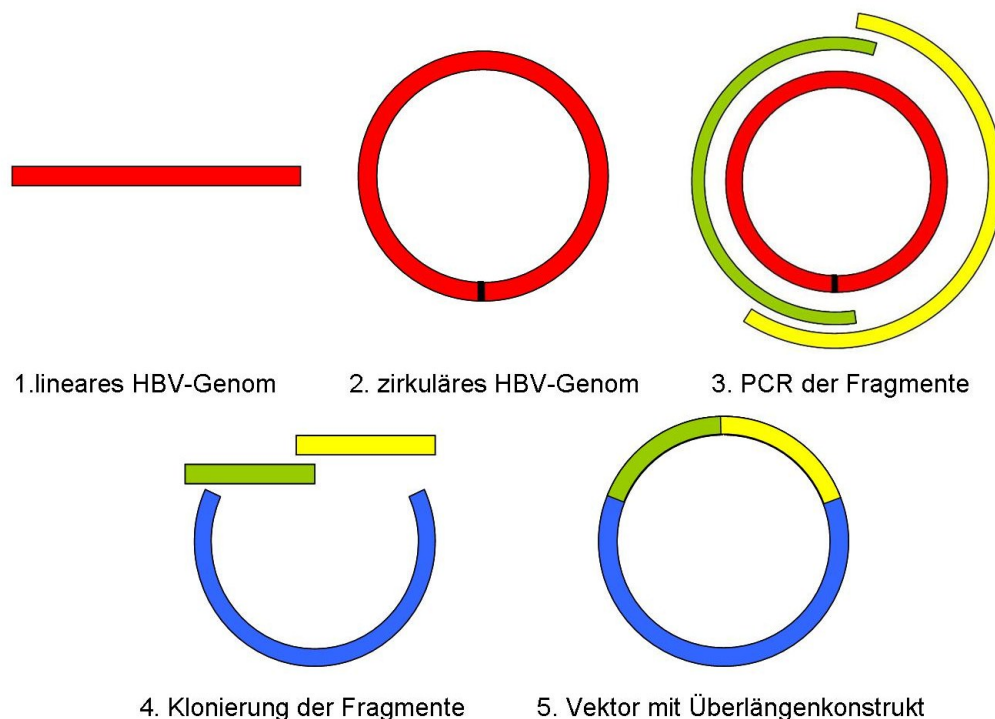


Abbildung 45: schematische Darstellung der Klonierung des HBV-Überlängenkonstrukts

1.) PCR aus Serum aufgereinigter oder zuvor klonierter HBV-Genome 2.) Zirkularisierung der linearen Ganzgenomamplifikate durch Ligation (schwarzer Strich: ligierte Enden) 3.) PCRs der Genomfragmente mit zirkularisiertem HBV-Genom als Template 4.) gleichzeitige zielgerichtete Klonierung beider Fragmente in Expressionsvektor 5.) vollständiger Expressionsvektor mit 1.1fachem HBV-Genom-Überlängenkonstrukt

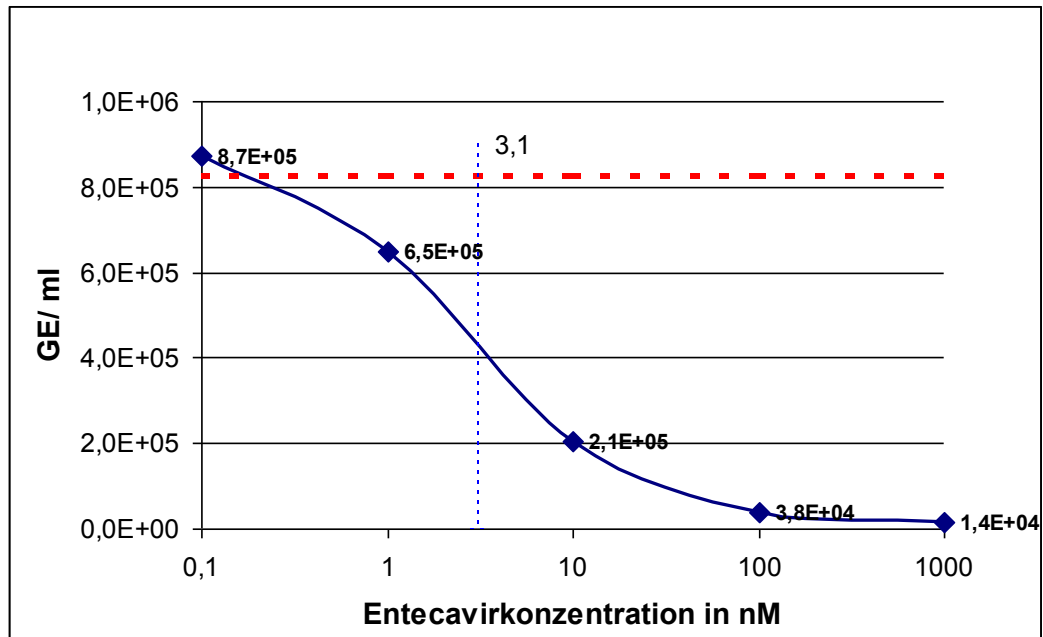


Abbildung 46: Inhibitionskurve des Überlängenkonstrukts

Die gestrichelte vertikale Linie zeigt die errechnete IC₅₀ an. Die horizontale gestrichelte Linie zeigt die GE/ ml im Überstand der nicht inhibierten Zellen an. Die Werte sind jeweils Einzelmessungen und rechts neben den Datenpunkten angezeigt.

Nach der erfolgreichen Herstellung des HBV-Überlängenkonstrukts aus dem Serum ID309 und Klonierung in den durch PCR erhaltenen Vektor pCEP-Puro, wurde das generierte Plasmid mit einem phänotypischen Test auf die Produktion neuer HBV-Genome untersucht. Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem Vektor transfiziert. Anschließend wurde ein Inhibitionsversuch mit Entecavir wie in 3.11 beschrieben durchgeführt.

Das neu generierte Plasmid führt zur Herstellung neuer Virusgenome. Bei dem nicht inhibierten Well konnten mehr als 8×10^5 GE/ ml im Überstand detektiert werden, während bei einer Konzentration von 1000 nM Entecavir weniger als 2×10^4 GE/ ml nachgewiesen werden konnten (Abbildung 46). Die errechnete IC₅₀ der einzelnen Inhibitionskurve zeigt mit 3,1 nM einen Resistenzfaktor von etwa 1,5 im Vergleich zu den in 4.5 und 4.6 gemessenen Werten für das Plasmid pCH9-3091.

5. Diskussion

5.1 Grundlagen des phänotypischen Resistenzassays

Für das Verständnis der Entwicklung von HBV-Resistenzvarianten ist es wichtig eine Verbindung zwischen einer bestimmten phänotypischen Ausprägung und dem Genotyp herstellen zu können. Aus diesem Grund wurden große Anstrengungen unternommen um geeignete Tests zu entwickeln. Die Grundlage jedes Resistenztests ist dabei die Einbringung einer replikationsfähigen HBV-DNA-Form in eine Hepatomzelllinie und die anschließende Quantifizierung der neu produzierten Genome bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Die so erhaltenen Daten können mit einem Wildtyp verglichen werden.

Bei der Umsetzung dieses Prinzips wurden verschiedene Systeme entwickelt, die sich in der DNA-Form, der Zelllinie, den Vektoren sowie der Nachweismethode unterscheiden. Diese Vielfalt erschwert den effektiven Vergleich der ermittelten Ergebnisse. Für die Entwicklung eines einheitlichen, kostengünstigen und vergleichbaren Tests im Hochdurchsatzverfahren, stellt sich deshalb die Frage, welche grundlegenden Methoden für die verschiedenen Schritte verwendet werden sollten.

Die Grundlage für die Erstellung einer replikationsfähigen DNA-Form bildet immer ein aus Serum aufgereinigtes Virus. Dieses wird mittels PCR amplifiziert um ausreichende Mengen für eine anschließende Weiterverarbeitung (vor allem Klonierung) zu erhalten. Die lineare Form des kompletten HBV-Genoms führt jedoch nicht zur Herstellung neuer Viren, da die prägenomische mRNA als Zwischenstufe der Replikation um etwa 200 bp länger ist als das eigentliche virale Genom (Abbildung 5). Diese mRNA wird durch das einmalige Überlesen der viralen Polyadenylierungssequenz während der Transkription hergestellt und benötigt entweder ein zirkuläres HBV-Genom oder ein lineares Überlängenkonstrukt als Matrize.

Eine elegante Methode zur Herstellung der natürlichen zirkulären HBV-Form wurde 1995 vorgestellt (Günther et al. 1995). Nach der Amplifikation des kompletten HBV-Genoms wurde ein Typ II Restriktionsenzym verwendet um einander komplementäre Genomenden zu generieren. Das so erhaltene lineare HBV-Genom konnte direkt transfiziert werden und wurde durch zelluläre Enzyme in die zirkuläre natürliche HBV-Form überführt. Diese Methode ähnelt der natürlichen Infektion am meisten, da keinerlei Fremd-DNA benötigt und die Transkription des Virus vom natürlichen Promoter kontrolliert wird. Eine vorherige Klonierung des Ganzgenoms zur Sequenzierung und Amplifizierung ist ebenfalls möglich. Anschließend kann das natürliche HBV-Genom aus dem Vektor ausgeschnitten werden.

Ein großer Nachteil der Methode ist der notwendige Restriktionsverdau vor der Transfektion, sowie eine eher geringe Transkription/Replikation des transfizierten Konstrukts (Durantel 2005).

Deutlich höhere Transkriptionsraten können mit vektorbasierten Überlängenkonstrukten erzeugt werden. Hier kommen vor allem Konstrukte mit einer 2 fachen, 1,3 fachen oder einer 1,1 fachen Überlänge unter der Kontrolle des natürlichen HBV-Promoters bzw. des CMV-Promoters zum Einsatz. Die Verwendung eines Überlängenkonstruktes mit der minimal notwendigen Genomlänge (1,1fach) unter der Kontrolle des CMV-Promoters erzielt dabei die besten Resultate (Durantel 2005).

Die Einbringung des jeweiligen Konstruktes wurde sowohl über Transduktion mit Baculoviren (Delaney und Isom 1998) und Adenoviren (Sprinzl et al. 2001), als auch über Transfektion erreicht. Die Transfektion stellt hierbei die einfachere und kostengünstigere Variante dar. Die am häufigsten verwendeten Hepatomzelllinien lassen sich mit kommerziellen Reagenzien zuverlässig transfizieren.

Als Zelllinie für ein Hochdurchsatzverfahren ist aufgrund der einfachen Handhabung, sowie des schnellen Wachstums und der Fähigkeit unter geringen FKS-Konzentrationen kultiviert zu werden die Zelllinie HuH7 besonders geeignet. Der Subklon HuH7-München soll keine Rezyklisation reifer Corepartikel in den Kern zulassen (persönliche Auskunft Frau Prof. Protzer) und die dadurch eventuell erzeugten Nebeneffekte umgehen können. Er wurde für die Erzeugung der Daten im Rahmen des HOPE-Projekts verwendet.

Für die Quantifizierung der neu produzierten Viren wurde lange Zeit die Southern Blot Analyse verwendet (Allen et al. 1998, Seignères et al. 2002). Diese Methode ist allerdings recht langwierig und umständlich. Sie ist nicht für die Erstellung eines Hochdurchsatzverfahrens geeignet. Eine sehr gute Alternative stellt die sensitive und genaue Quantifizierungsmethode der Real-Time PCR dar. Sie erlaubt die genaue Detektierung auch kleiner Virusmengen und deshalb die Verkleinerung der Zellkultur auf ein Minimalformat. Dies ermöglicht die Erstellung eines Hochdurchsatzverfahrens mit Mehrfachansätzen und damit die genauere und zuverlässigere Ermittlung von phänotypischen Werten.

Für den Resistenztest kann sowohl die Quantifizierung intrazellulärer als auch der in den Überstand abgegebener Viren verwendet werden. Da für die Quantifizierung intrazellulärer Viren eine Lyse der Zellen erforderlich ist, stellt die extrazelluläre Quantifizierung die einfachere Variante dar.

Aufgrund der dargelegten Fakten wurde als Grundlage des phänotypischen Resistenzassays ein Plasmid mit einem 1,1fachen Überlängenkonstrukt unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (pCH9-3091) verwendet. Das Einbringen des Plasmids in die HuH7-Zellen erfolgte über eine Transfektion und die anschließende Quantifizierung der im Überstand befindlichen Viren über Real-Time PCR.

5.2 Klonierung der Patientenisolat

Der als Wildtyp verwendete Vektor pCH9-3091 dient ebenfalls als Vektorkassette zur Erzeugung replikationsfähiger Überlängenkonstrukte durch Klonierung von Patientenisolaten. Die Klonierung eines Ganzgenoms in eine Vektorkassette zur Erzeugung eines 1,1fachen Überlängenkonstrukts wurde ebenso bereits beschrieben (Yang et al. 2004), wie die Erzeugung des gesamten Überlängenkonstrukts ohne Vektorkassette aus dem Patientenisolat (Durantel 2004). Für die Klonierung großer Mengen verschiedener Isolate sind beide Methoden nur bedingt geeignet. Die Verwendung einer Vektorkassette in Kombination mit der Klonierung des Ganzgenoms, wie von Yang et al. beschrieben, beruht auf der Erzeugung eines Ganzgenoms durch die weiter oben beschriebene von Günther entwickelte Methode. Da jedoch das verdaute Genom und der Vektor selbstkomplementäre Enden aufweisen, tritt bei der Ligationsreaktion häufig eine intramolekulare Rezirkulation sowohl beim Vektor als auch bei dem HBV-Genom auf. Aus diesem Grund ist die Klonierung zwar grundsätzlich möglich aber ineffizient. Die von Durantel vorgeschlagene Methode beinhaltet die Amplifikation zweier unterschiedlich großer PCR-Produkte und die anschließende Klonierung beider Fragmente in den Vektor in nur einem Schritt. Hierzu werden jedoch 3 Restriktionsschnittstellen, sowie vier Primerbindestellen benötigt. Die angegebene Klonierungseffizienz liegt bei 50 bis 75%. Diese Methode ist aufgrund der hohen Anzahl verwendeter Primer und Restriktionsenzyme ebenfalls nur bedingt für ein Hochdurchsatzverfahren geeignet. Alle HBV-Genome, die nicht die entsprechenden Bindestellen oder zusätzliche Schnittstellen der verwendeten Enzyme besitzen sind von der Klonierung ausgeschlossen. Aufgrund einer fehlenden Vorklonierung besteht außerdem die große Gefahr die Fragmente zweier unterschiedlicher HBV-Varianten zu verbinden und somit Artefakte zu erzeugen.

Die für den phänotypischen Test verwendete Methode beschränkte sich deshalb auf die konventionelle Klonierung eines subgenomischen HBV-Fragments mit zwei Restriktionsenzymen und 2 Primern. Bei dem klonierten 2,4 kb großen Fragment handelt es sich um den Polymeraserahmen der etwa 70% des HBV-Genoms umspannt und alle relevanten Bereiche enthalten dürfte, die zu einer Resistenz beitragen könnten. In diesem Bereich sind außerdem sämtliche Informationen der Oberflächenproteine in einem alternativen Leserahmen enthalten (siehe 1.5, Abbildung 5). Die Klonierung des kleineren Fragments bietet neben der sehr hohen Klonierungseffizienz (etwa 90% positive Klone, Daten nicht gezeigt) auch weitere Vorteile. Die verwendeten Primerbindestellen sind in den verschiedenen HBV-Genomen hochkonserviert und die Restriktionsenzyme sind meist nur an der gewünschten Stelle vorhanden. Dadurch kann die PCR die breite Masse der verschiedenen HBV-Varianten amplifizieren und der Klonierung zugänglich machen. Aufgrund der geringeren Größe des Amplifikats dürfte die PCR auch sensitiver sein als die

PCR zur Erzeugung eines Ganzgenoms. Dies müsste allerdings noch experimentell bestätigt werden.

Die konstanten Bereiche der Vektorkassette beinhalten außerdem die Bindestellen der Primer für die diskriminative Real-Time PCR, wodurch diese nicht bei jeder HBV-Variante angepasst werden muss. Dies erlaubt die Quantifizierung der Genome bei allen Patientenisolaten unter gleichen Bedingungen bei minimalem Aufwand.

5.3 Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens

Mit Hilfe der genannten Methoden wurde das Hochdurchsatztestverfahren entwickelt. Als erstes galt es zu klären ob eine Verkleinerung der Zellkultur auf ein 96-Well-Format (200 µl Medium und ca. 40 000 Zellen pro Well) generell möglich ist und ob die Zellen bei den gegebenen Bedingungen (Verhältnis Kulturmedium zu Zellmenge, Wachstumsfläche zu Volumen, gegebene Oberfläche zum Gasaustausch mit der Umgebung) längere Zeit überleben und ungehindert exprimieren können. Wie aus Abbildung 13 hervorgeht ist weder die Anzahl der überlebenden Zellen noch die generelle Stärke der Expression durch die Verkleinerung der Zellkultur auf ein 96-Well Format beeinflusst.

Der Test auf das Signal des pSEAP2-control Reporterplasmids war außerdem notwendig um festzustellen, ob dieses Konstrukt geeignet ist um Transfektionseffizienzen im 96-Well-Format zu ermitteln. Ein Reporterplasmid ist bei der Transfektion aus verschiedenen Gründen von Vorteil. Zum einen ist es unabdingbar, wenn neben der generellen Resistenz einer HBV-Variante auch deren Replikationsfähigkeit bestimmt werden soll. In diesem Fall müssen die Transfektionseffizienzen des Wildtypplasmids und der Variante miteinander normalisiert werden um aussagekräftige Vergleiche durchführen zu können. Zum anderen dient das Konstrukt als generelles Kontrollelement um den Erfolg einer Transfektion festzustellen, bevor weitere Schritte unternommen werden. Das pSEAP2-control-Plasmid exprimiert eine um den Membrananker verkürzte Version der humanen placentaren alkalischen Phosphatase (secreted alkaline phosphatase). Durch diese Veränderung wird das Enzym nicht mehr in der Zellmembran verankert sondern in den Überstand abgegeben (Berger et al. 1988). Diese Phosphatase ist im Gegensatz zu allen endogenen zelleigenen Phosphatasen extrem hitzestabil und wird nicht durch L-Homoarginin inhibiert (Cullen & Malim, 1992), wodurch mittels einer Inkubation bei 65°C und anschließender Reaktion unter dem genannten Inhibitor jegliches endogenes Signal eliminiert werden kann. Diese Eigenschaft zusammen mit der Linearität des Signals über einen großen Messbereich und der Sensitivität macht es zu einem idealen Reporterkonstrukt für den Resistenztest. Die Transfektionseffizienz kann ohne großen Aufwand durch die Abnahme eines geringen Volumens des Überstandes ermittelt werden und benötigt keine Lyse der Zellen, wie es zum Beispiel bei Luciferase-Assays der Fall ist. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das detektierte Signal direkt abhängig von der

Menge an transfiziertem pSEAP2-control Plasmid ist (Abbildung 14) wurde es für die Normalisierungen der Transfektionen verwendet. Nach der Etablierung der Methode war es außerdem möglich verschiedene Transfektionsreagenzien quantitativ miteinander zu vergleichen, um das optimale Transfektionsreagenz für die verwendete Zelllinie zu finden (Abbildung 15). Bei dem Test zeigte FuGene HD die mit Abstand höchste Effizienz. Die ermittelten Ergebnisse ließen sich außerdem durch die parallele Transfektion von pmax-GFP stützen (Abbildung 15). Die beiden Reagenzien GeneJuice und JetPrime zeigen in etwa das gleiche SEAP-Signal aber eine unterschiedliche Anzahl leuchtender Zellen bei der Transfektion von pmaxGFP. Dies ist auf Transfektionsschwankungen und die Wahl des Bildausschnittes zurückzuführen. Ungeachtet dieser geringen Unterschiede bewegt sich die Transfektionseffizienz beider Mittel nicht in der Größenordnung von FuGene HD.

Einer der wichtigsten Aspekte für die Sensitivität und Genauigkeit des Tests ist die Nachweismethode der neu gebildeten Genome des HBV. Die Real-Time PCR zur Quantifizierung der Virus DNA bietet gegenüber dem Southern Blot deutliche Vorteile (siehe 5.1), hat aber einen entscheidenden Nachteil: Die nachgewiesenen Genome werden anders als beim Southern Blot nicht nach Größe aufgetrennt, weshalb es nicht möglich ist die neu produzierten HBV-Genome und die noch vorhandenen Plasmide aus der Transfektion getrennt voneinander zu detektieren. Da die Menge an transfiziertem Plasmid auch mit dem Wechseln des Überstands und nach optimaler Transfektionseffizienz um etwa Faktor 100 größer ist als die des neu produzierten Virus (Abbildung 17), wäre eine Inhibition der Replikation theoretisch nicht feststellbar. Dieses Problem wird durch eine spezielle Real-Time PCR umgangen, die sich die Unterschiede zwischen den Plasmiden und dem natürlichen HBV-Genom zunutze macht.

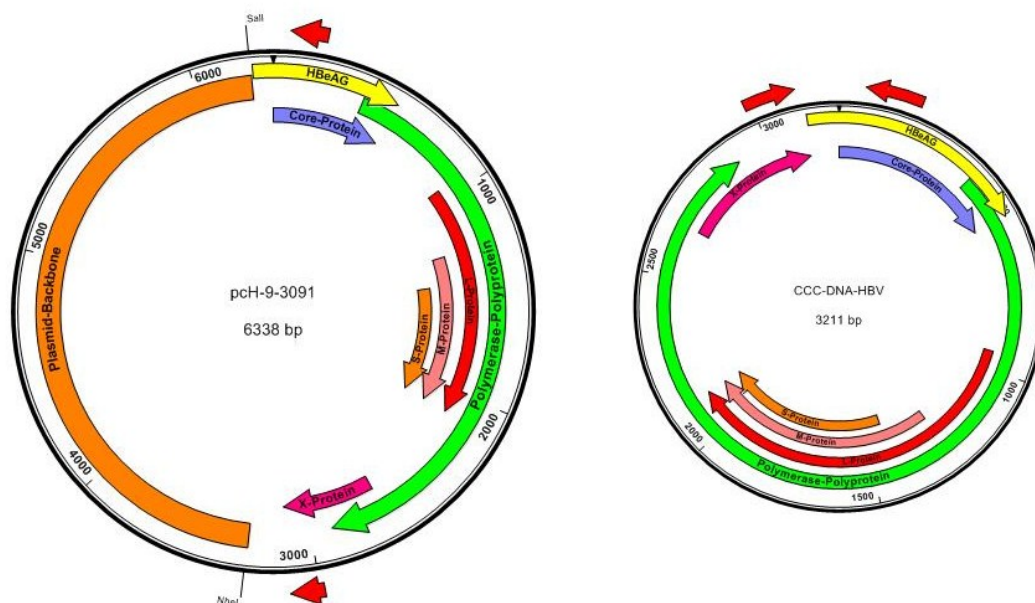


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Lage der Primerbindestellen (rot) der HOPE-PCR im verwendeten Plasmid pCH9-3091 (links) und in der zirkulären HBV-Form (rechts)

Die Primerbindestellen sind so gewählt, dass sie im natürlichen HBV-Genom einen Abstand von etwa 400 bp aufweisen, während sie im zuvor transfizierten Plasmid aufgrund der zusätzlichen Vektorsequenz einen deutlich größeren Abstand haben (Abbildung 47).

Mit einer auf 400 bp angepassten Elongationszeit lässt sich somit eine diskriminative PCR durchführen, die HBV-Genome um etwa den Faktor 1000 besser als die verwendeten Plasmide erkennt (Abbildung 16).

Die ungewollte Erkennung der Plasmide ist jedoch ebenfalls konzentrationsabhängig und die PCR weist eine ähnliche Effizienz auf, wie die auf Grundlage des natürlichen HBV-Genoms (Verdopplung der Amplifikatmenge pro Zyklus). Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, dass der gemessene Hintergrund auf der Amplifikation des sehr langen, die Vektorsequenz beinhaltenden PCR-Produkts basiert, da das so produzierte Template bei jedem weiteren Amplifikationsschritt ebenfalls nur mit sehr geringer Effizienz amplifiziert würde. Die wahrscheinlichere Erklärung für das niedrigere aber konzentrationsabhängige Signal wäre das Anheften kurzer unvollständiger DNA-Fragmente vom 5'-Ende an das 3'-Ende beziehungsweise umgekehrt. Dieses seltene Ereignis wird durch die redundanten Sequenzen an den Enden des HBV-Überlängenkonstrukts begünstigt und das entstehende Amplifikat wäre identisch mit dem Amplifikat bei der PCR des natürlichen HBV-Genoms. Bei der PCR des HBV-Dimer-Plasmides, welches als Positivkontrolle diente, ist sogar ein höheres Signal als bei dem natürlichen HBV-Genom zu erkennen. Dieses Ergebnis ist aufgrund der doppelten Anzahl möglicher Bindestellen für die PCR-Primer und geringen Messungenauigkeiten zu erwarten.

Bei einem Überschuss der Plasmide von mindestens Faktor 100 und einer Diskriminierung der Detektion von Faktor 1000 ist theoretisch eine Inhibition von maximal Faktor 10 feststellbar. Da die Transfektion natürlichen Schwankungen unterliegt und viele HBV-Resistenzvarianten aufgrund der Veränderungen in der Polymerase eine verringerte Replikationsfähigkeit aufweisen (Zoulim und Locarnini 2009), ist die diskriminative PCR allein nicht ausreichend um ein genügend großes Detektionsfenster für den Assay zu erzeugen. Da die Höhe des detektierten Hintergrunds direkt abhängig ist von der Menge an vorhandenen Plasmiden, wurde versucht diese durch mehrfaches Wechseln des Mediums nach der Transfektion zu verringern. Aus Abbildung 17 geht hervor, dass dadurch nicht der gewünschte Effekt hervorgerufen werden konnte. Eine geringfügige (Faktor 2) Verringerung der Plasmidmenge war nur bei der Verwendung von PBS als Waschmedium feststellbar und ging einher mit der Verringerung der detektierten Menge neu produzierter Viren, sowie des SEAP-Signals (Abbildung 18). Es ist deshalb davon auszugehen, dass der Effekt auf dem Ablösen eines Teils der Zellen und nicht auf dem Abwaschen der Plasmide beruht. Da die Plasmide nicht durch einfaches Wechseln des Mediums entfernt werden können, lässt sich schlussfolgern, dass sie in

irgendeiner Form an die Zelloberfläche gebunden haben müssen. Der Einsatz von Benzonase, zum Verdau der im Überstand befindlichen Plasmide, hat ebenfalls keinen nennenswerten Effekt auf die Anzahl detektierter Genome (Daten nicht gezeigt). Sie sind wahrscheinlich durch die Bindung an die Zellen vor einem Verdau geschützt. Die Trypsinierung der Zellen bietet sich an um zelluläre Oberflächenproteine relativ unspezifisch abzutrennen und damit auch eventuell gebundene Plasmide zu entfernen. Nach einer mechanischen Trennung der Zellen von unspezifisch bindenden und durch Trypsinierung frei gewordenen Fragmenten durch Zentrifugation, sollte sich somit ein Teil der Plasmide entfernen lassen. Wie aus den Abbildungen 19 und 20 hervorgeht, lässt sich durch diese Methode der Plasmidhintergrund tatsächlich deutlich verringern. Da der Wascheffekt bereits bei dem zweiten Waschschrift stark abnimmt, wurde beschlossen die Zellen jeweils 3 mal nach dieser Methode zu waschen, bevor sie auf 96-Well Platten ausgesät werden. Ein vierter Waschschrift dürfte keine nennenswerten Effekte mehr haben. Mit der Kombination aus der diskriminativen PCR und den Waschschriften, lässt sich das Detektionsfenster der Inhibitor auf 2 bis 3 Logstufen erweitern (Abbildung 20). Damit ist die Methode sensitiv genug um auch schlecht replizierende Virusvarianten und Versuche mit suboptimaler Transfektionseffizienz auswerten zu können.

Ein weiterer Punkt, der zur Verbesserung des Assays beitragen kann, ist die Optimierung der Inkubationszeit. Dabei muss ein Kompromiss zwischen Inkubationsdauer und Signalstärke gefunden werden. Aus Abbildung 21 geht hervor, dass nach einer zweitägigen Inkubation etwa ein Zehntel der Viren im Vergleich zur dreitägigen Inkubation vorhanden ist. Die Erhöhung des Signals um eine Logstufe ist für die Sensitivität des Assays entscheidend, weshalb es nicht sinnvoll ist die Inkubationszeit auf zwei Tage zu kürzen. Eine längere Inkubationszeit als drei Tage ist nicht zu empfehlen, da die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel und zu hoher Konfluenz die Apoptose einleiten und damit das Ergebnis verfälschen würden.

Mit dem etablierten Testsystem konnten innerhalb einer Woche mindestens 10 Patientenisolat bezüglich der Resistenz gegen Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir sowie der Fitness charakterisiert werden. Für jede einzelne Inhibitorskurve liegen dabei jeweils 15 Messpunkte vor (Dreifachansatz, 5 Konzentrationen), sowie 12 Messpunkte ohne Inhibitor. Das entspricht 72 generierten Datenpunkten pro Patientenisolat bzw. 720 Datenpunkten pro Woche. Die große Datenmenge pro Isolat trägt entscheidend zur Genauigkeit und Verlässlichkeit des Resistenztests bei.

5.4 Evaluierung des Tests anhand des HBV-Wildtyps

Nachdem der Wildtyp wiederholt in den phänotypischen Assay eingesetzt wurde, war es möglich die Genauigkeit des Tests anhand der Zusammenfassung der Daten zu ermitteln und die Ergebnisse mit bereits

publizierten Messungen zu vergleichen. Die Summe aus den Daten von zehn Wiederholung (30 Inhibitorenkurven pro Inhibitor) diene dabei als Grundlage für die Evaluierung. In Abbildung 22 sind die Konsensuskurven der Versuche mit den vier Inhibitoren gezeigt. Hier wird deutlich, dass die gewählten Inhibitorkonzentrationen jeweils den linearen Bereich, sowie den Bereich der IC_{50} des Wildtyps abdecken. Die IC_{50} der verschiedenen Inhibitoren liegt dabei immer mindestens zwei Logstufen niedriger als die höchste eingesetzte Konzentration des jeweiligen Inhibitors. Somit können Resistenzen mindestens bis Faktor 100 nachgewiesen werden. Aus den in Tabelle 12 zusammengefassten Werten kann man erkennen, dass bei der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration der Inhibitoren die relative Replikation unter 1% beträgt. Für den Wildtyp kann damit eine Inhibition von mehr als 2 Logstufen zuverlässig nachgewiesen werden. Die ermittelten IC_{50} -Werte der einzelnen Inhibitoren lassen sich aufgrund der bereits erwähnten hohen Diversität der verschiedenen Methoden nur recht schwer mit bereits publizierten Werten vergleichen. Eine Publikation bei der die vier erwähnten Inhibitoren ebenfalls mit HuH7 Zellen getestet wurden (Tabelle 23), weist recht ähnliche IC_{50} -Werte auf (Villet et al. 2007). Die dennoch vorhandenen Unterschiede in den absolut ermittelten Werten lassen sich durch die Verwendung des Subklons HuH7-München in dem hier entwickelten Test, sowie durch die anderen Methoden (Southern Blot, intrazelluläre Genome quantifiziert, 5 Tag Inkubationszeit der Zellen usw.) der erwähnten Publikation erklären.

Tabelle 23: Vergleich der IC_{50} -Werte dieser Arbeit mit den Werten aus den erwähnten Publikationen

Werte von	Verwendete Zelllinie	IC_{50} in nM mit Standardabweichung in Klammern			
		Adefovir	Entecavir	Lamivudin	Tenofovir
dieser Arbeit	HuH7-München	995 (± 269)	1 ($\pm 0,4$)	90 (± 43)	1087 (± 437)
Villet et al. 2007	HuH7	4800 (± 700)	4,5 ($\pm 1,3$)	50 (± 10)	4600 (± 500)
Langley et al. 2007	HepG2	2636 (± 1549)	5,3 ($\pm 3,5$)	1491 (± 1033)	2482 (± 1938)

Der relative Vergleich der Inhibitoren untereinander bezüglich ihrer in vitro Wirksamkeit deckt sich ebenfalls mit bereits publizierten Werten. Entecavir hat hierbei die höchste Wirkung und ist um etwa eine Logstufe wirksamer als Lamivudin, welches wiederum 2 Logstufen wirksamer als Adefovir und Tenofovir ist. Diese Resultate wurden sowohl in Untersuchungen mit HuH7-Zellen (Villet et al. 2007) als auch mit HepG2-Zellen (Langley et al. 2007) erzielt. Adefovir und Tenofovir sind beide sehr ähnliche, dem Adenosinmonophosphat nachempfundene, Alkylphosphonate, die sich nur um eine Methylgruppe unterscheiden (Abbildung 11). Eine ähnliche Wirkung beider Mittel ist damit zu erwarten. Lamivudin hingegen ist ein dem Cytidin nachempfundenes L-

Nucleosidanalogon und unterscheidet sich deshalb in der Wirkungsstärke. Ähnliches gilt auch bei dem D-Cyclopentan Entecavir, welches dem Guanosin nachempfunden ist.

In Tabelle 12 sind die Mittelwerte der durch lineare Regression berechneten IC_{50} aus den 10 Einzelversuchen angegeben. Hier lässt sich eine Standardabweichung bei den unterschiedlichen Inhibitoren von 27,1 % bis 47,5 % mit einem Mittelwert von etwa 40% feststellen. Interessant ist der Vergleich aus den so ermittelten Werten mit den berechneten IC_{50} aus den Mittelwerten der Konsensuskurven (Tabelle 12 rechts). Die Werte weichen jeweils um nur etwa 5% ab. Die Schwankungen der IC_{50} -Werte aus den Wildtypmessungen lassen sich also nicht auf eine ungenaue Regressionsberechnung oder ungünstige Auswahl der Messpunkte zurückführen, sondern stellen die natürlichen Messschwankungen des Tests dar.

Bei dem Testverfahren existieren viele einzelne Schritte (Erstellung der Inhibitorverdünnungen, Verteilung der Zellen auf 96-Well-Format, Abnahme der Überstände, Pippetierschritte bei der Real-Time PCR und so weiter), die jeweils einen kleinen aber insgesamt unwesentlichen Einfluss auf das Endergebnis ausüben. Die Summe der verschiedenen Fehlerfaktoren führt dann zu den gemessenen Schwankungen. Dies sind die Voraussetzungen um die gemessenen Werte als normalverteilt anzusehen. Geht man von einer normalverteilten Schwankung mit einem Resistenzfaktor von 0,4 aus (entspricht Standardabweichung von 40%), so lässt sich die Wahrscheinlichkeitsdichte der Messwertverteilung des Wildtyps gegen den Resistenzfaktor grafisch darstellen (Abbildung 23, blaue Kurve). Bei einer Normalverteilung liegen 99% der gemessenen Werte innerhalb eines Intervalls von 2,575 mal der Standardabweichung und 95% innerhalb eines Intervalls von 1,96 Mal der Standardabweichung. Die obere Grenze des 99% Intervalls entspräche beim Wildtyp damit einem Resistenzfaktor von 2,03. Ein gemessener Resistenzfaktor von über 2 kann deshalb als Indiz für eine Resistenz angesehen werden, während ein Resistenzfaktor kleiner als 2 keine eindeutige Tendenz zur Resistenz erkennen lässt. Geht man von der wahrscheinlichen Annahme aus, dass sich die Messwerte von Virusvarianten mit sehr geringen Resistenzfaktoren ebenfalls mit gleich großen Standardabweichungen normalverteilen, kann man auch Wahrscheinlichkeitsdichten von Varianten mit einem Resistenzfaktor von 2 (Abbildung 23, rosa Kurve) bzw. 3 (grüne Kurve) in der Grafik darstellen und die 99%-Intervalle berechnen. Dabei fällt auf, dass sich die Wahrscheinlichkeitsdichten einer Variante mit einem Resistenzfaktor von 2 sehr stark mit denen des Wildtyps überschneiden. Die Untergrenze des gemessenen Resistenzfaktors (99% Intervall) läge bei einer solchen Variante bei 0,97. Ein ermittelter Resistenzfaktor von 1,5 wäre demnach genauso wahrscheinlich einer Wildtypvariante wie einer Variante mit RF von 2 zuzuweisen. Erst bei einer Variante mit einem Resistenzfaktor von 3 (untere 99% Intervallgrenze: 1,97) gibt es kaum Überschneidungen mit der

Wahrscheinlichkeitsdichte des Wildtyps. Weit über 95% aller gemessenen Werte würden sich demnach nicht überschneiden. Aufgrund dieser Überlegungen lässt sich der Cut-Off für die Feststellung einer signifikanten Resistenz bei einem Resistenzfaktor von ungefähr 3 setzen.

5.5 Berechnungsmodell der IC₅₀

Für die Berechnung der IC₅₀ sind verschiedene mathematische Modelle geeignet. Zum einen besteht die Möglichkeit alle Messpunkte einer Inhibitionsreihe in die Regression einer logarithmischen Kurve mit 3 oder mehr Parametern einzubeziehen und durch die erhaltene Regressionsgleichung die IC₅₀ zu berechnen und zum anderen kann die logarithmische Regression in eine lineare Regression durch Verwendung logarithmierter Konzentrationen überführt werden. Die erste Methode bietet sich zur Auswertung einer sehr großen Datenmenge mit mathematisch gut beschreibbaren und insgesamt recht gleichförmigen Inhibitionskurven an. Bei diesen Bedingungen weist sie ein hohes Maß an Genauigkeit auf und kann mittels eines Computerprogramms vollkommen automatisiert erfolgen. Die zweite Methode ist vor allem für heterogenere Kurven und kleinere Datensätze geeignet. Der Nachteil ist, dass nicht alle Daten in das Regressionsmodell mit einbezogen werden, sondern nur die Messpunkte, welche in dem vorher definierten linearen Bereich liegen. Für den hier generierten noch überschaubaren Datensatz wurde auf die lineare Regression zur Auswertung der Daten zurückgegriffen, da sie durch Anpassung des linearen Bereichs eine größere Flexibilität bietet und somit eine individuellere Auswertung der einzelnen Kurven bei niedrigerem Rechenaufwand ermöglicht. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Wildtyp bestätigen die Genauigkeit dieses Berechnungsmodells.

5.6 Klinische Bedeutung der in vitro ermittelten Resistenz- und Fitnesswerte

Die mit in vitro Resistenztests festgestellten Resistenzen sind nicht ohne Einschränkungen auf die klinische Resistenz übertragbar. Neben der allgemeinen Resistenz einer Virusvariante spielen noch viele andere virale und zelluläre Faktoren in die Ausbildung einer Resistenz in vivo hinein. Die Infektiosität, Sekretionsfähigkeit und Immunogenität seien auf Virusseite, das Immunsystem, genetische Faktoren und Metabolismus seien auf der Wirtsseite genannt. Die Resistenz und vor allem die Fitness können von in vitro ermittelten Werten abweichen. Trotz dieser Tatsachen sind Resistenztests geeignet um Virusvarianten phänotypisch zu charakterisieren, da sie die Tendenz einer Resistenz ebenso gut vorhersagen können, wie die ungefähre Ausprägung im Vergleich zu bereits bekannten Varianten zu denen auch in vivo Daten vorliegen. Eine in vitro festgestellte statistisch signifikante Resistenz muss allerdings keine klinische Relevanz haben. Ein Resistenzfaktor von 6 ist zum

Beispiel signifikant erhöht gegenüber dem Wildtyp, ist jedoch bei Tenofovir wahrscheinlich nicht ausreichend um eine klinische Resistenz hervorzurufen, da die im Patienten erreichbare Konzentration des Inhibitors immer noch genügt um die virale Replikation vollständig zu unterdrücken. Bei Adefovir wäre der gleiche Resistenzfaktor jedoch bereits mit einer klinischen Resistenz verbunden, da aufgrund der Nephrotoxizität nur ein Bruchteil (etwa 4%) der Konzentration von Tenofovir erreicht werden kann, bei etwa gleicher Wirkungsstärke der beiden Mittel. Die Mittel Lamivudin und Entecavir sind deutlich potenter, weshalb auch deutlich höhere Resistenzfaktoren notwendig sind, um klinisch relevante Resistenzen hervorzurufen. Eine genaue Festlegung des klinischen Cut-offs ist für die verschiedenen Inhibitoren ohne umfangreiche Korrelationen zwischen klinischen Daten und phänotypischen Messungen in dieser Arbeit noch nicht möglich, letztlich aber ein Ziel des HOPE-Projekts.

Bei den ermittelten Fitnesswerten müssen ebenfalls einige Überlegungen mit einbezogen werden. Abbildung 34 und Tabelle 19 zeigen zwar deutlich, dass die ermittelten Fitnesswerte des Assays aufgrund des parallel mitgeführten Wildtyps und der Transfektionsnormalisierung reproduzierbar sind, aber die so generierten Daten spiegeln nicht unbedingt die tatsächliche Fitness einer Variante wieder. Es ist dabei besonders zu beachten, dass aufgrund der Klonierung eines subgenomischen Fragments (siehe 3.2) die Patientenisolat immer eine Chimäre aus zwei Virusvarianten darstellen, was besonders dann Bedeutung hat, wenn die beiden Varianten nicht den gleichen Genotyp besitzen. Der ORF des Core-Proteins, sowie der X-ORF überlappen mit dem des Polymerase-ORFs (siehe 1.5, Abbildung 5). Diese beiden Proteine sind deshalb bei den Patientenisolaten immer Kombinationen aus dem Wildtyp und der einklonierten Virusvariante. Da die Verpackung des HBV-Prägenoms untrennbar mit dessen reverser Transkription verbunden ist, könnte das Core-Protein durchaus einen deutlichen Einfluss auf die Replikationseffizienz ausüben. Eine Auswertung der Fitnesswerte des Assays ist deshalb am sinnvollsten, wenn die Genotypen der beiden kombinierten Genome gleich sind und sollte immer mit dem hier erläuterten Hintergrund betrachtet werden.

Hinzu kommt, dass nur die extrazellulären Genomequivalente betrachtet werden, wodurch sekretionsdefiziente Varianten eine scheinbar verminderte Fitness bezüglich der Replikation aufweisen. In vivo bestünde tatsächlich eine verringerte Fitness. Diese läge aber auf der Ebene der Infektiosität, weil keine ausreichende Virämie erzeugt würde. Dieses potenzielle Problem könnte nur umgangen werden, wenn sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Genome quantifiziert würden. Da die intrazelluläre HBV-DNA mutmaßlich ein pathogenetischer Faktor ist, kommt der Erfassung dieser Varianten eine hohe Bedeutung zu. Die Frequenz von unbekannten Sekretionsdefizienzvarianten lässt sich zurzeit nicht abschätzen.

Ein weiterer Punkt ist, dass eine kleine in vitro festgestellte Erhöhung der Fitness einen weitaus stärkeren in vivo Effekt hervorrufen könnte, weshalb die hier ermittelten Werte eventuell auch als verzerrt angesehen werden dürften.

5.7 Auswertung der Daten des HOPE-Projekts

Zur besseren Übersicht wurden die getesteten Patientenisolats anhand der vorhandenen bekannten Resistenzmutationen in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dabei wurde primär auf Resistenzmutationen Rücksicht genommen, die eindeutig und zweifelsfrei mit einer Primärmutation gegen mindestens einen der verwendeten Inhibitoren assoziiert werden konnten. Dies sind Mutationen an den Stellen A181, M204 und N236 der reversen Transkriptase des HBV. Die ursprünglich postulierte, aber nicht existente Adefovir-Primärmutation an der Stelle 233 wurde für die Einteilung nicht berücksichtigt. Als Sekundärmutation zur weiteren Unterteilung wurden Mutationen an den Stellen L80, I169, V173, L180, T184, A194, S202, V214, Q215 sowie M250 berücksichtigt. Ein Großteil der Patientenisolats besitzt neben den genannten Mutationen auch weitere Unterschiede im sequenzierten Bereich (mindestens Aminosäuren 80 bis 250 des RT-Bereichs), die im Anhang aufgeführt sind. Es könnte sich dabei um Polymorphismen handeln, aber es ist nicht auszuschließen, dass einige dieser Aminosäureaustausche (im Vergleich zum verwendeten Wildtyp) eine unbekannte Primär- oder Sekundärmutation unter Therapie-induzierter Selektion darstellen. Ein Einfluss von Mutationen des Polymerase-ORFs, die außerhalb des RT Bereichs liegen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. In der Masterarbeit von Pia Seiz konnten mit der Untersuchung des in dieser Arbeit charakterisierten Patientenisolats FvB150-1 Hinweise auf solche Einflüsse erhalten werden. Die Untersuchung jeder einzelnen Aminosäurevariante würde jedoch den Rahmen der Arbeit sprengen und ist deshalb nicht Bestandteil dieser Diskussion. Im Rahmen des HOPE-Projektes sollen die generierten Sequenzdaten allerdings einer bioinformatischen Analyse unterzogen werden um jeder einzelnen Mutation eine phänotypische Bedeutung zuzuordnen. Dieses Ziel ist allerdings nur mit der Generierung von deutlich mehr phänotypischen Daten und kompletten Sequenzinformationen zu erreichen.

5.7.1 Patientenisolats ohne bekannte Resistenzmutationen

In Tabelle 13 sind die Resistenzfaktoren und Fitnesswerte der Isolate aufgeführt, bei denen keine bekannten Resistenzmutationen vorlagen. Betrachtet man P1 als Sonderfall, so liegen alle ermittelten Resistenzwerte in dem postulierten 99%-Intervall des Wildtyps. Nur der Resistenzfaktor von 2,6 bei der Adefovirmessung von P4 ist leicht erhöht, hat aber noch keinen Resistenzfaktor über 3. Dieser Wert könnte auf eine schwache noch nicht erkannte Adefovir-Primärmutation hindeuten, aber ist möglicherweise nur eine Schwankung. Die Ergebnisse von P2 bis P5 bestätigen dagegen die bisher

bekannte Theorie zur Resistenzentwicklung sowie die Genauigkeit der hier vorgestellten Methode. P1 stellt hierbei allerdings eine deutliche Ausnahme dar (Abbildung 25). Bei diesem Isolat konnte nicht nur eine Tendenz zur Resistenz gegen Adefovir und Lamivudin sondern auch eine hoch signifikante Resistenz gegen Tenofovir festgestellt werden. Die virale Fitness dieser Variante liegt außerdem weit über der des Wildtyps. Da die Fitnesswerte der meisten Resistenzvarianten unter der des Wildtyps liegen, ist diese Eigenschaft besonders hervorzuheben. Interessanterweise zeigt P1 die Mutation V214A, die bereits mit einer leichten Resistenz bei Lamivudin und einer mittleren Resistenz bei Adefovir in Verbindung gebracht wurde (Ghany und Liang 2007). Das Isolat würde damit die Bedeutung dieser Mutation grundsätzlich bestätigen. Ein zweites Isolat der Gruppe (P2) zeigt jedoch ebenfalls die genannte Mutation, aber weist weder eine Resistenz noch eine erhöhte Fitness auf. Die Mutation V214A kann daher mit den phänotypischen Daten von P2 als *alleinige* entscheidende Mutation für die Resistenzentstehung gegen eines der Mittel ausgeschlossen werden. Eine Beteiligung an der Resistenzbildung zusammen mit einer weiteren unbekannten Mutation ist jedoch möglich und könnte das zutreffende Szenario für P1 sein. Für den Phänotyp von P1 könnte allerdings auch eine noch völlig unbekannte Primärmutation allein verantwortlich sein. Vergleicht man die gesamten Aminosäuresequenzen im untersuchten RT-Bereich beider Isolate (siehe Anhang) sind keine Unterschiede festzustellen. Die unterschiedlichen Phänotypen sind deshalb wahrscheinlich auf Unterschiede außerhalb des genannten Bereichs zurückzuführen und können mit den gegebenen Daten nicht weiter eruiert werden. Ebenfalls zu beachten ist, dass sowohl P1 als auch P2 eine *nonsense*-Mutation an Stelle 69 des überlappenden ORFs des SHBs-Proteins besitzen und damit höchstwahrscheinlich sekretionsdefizient sind. Die gemessene Fitness der beiden Isolate kann deshalb verändert sein. Die gemessenen Resistenzen sind davon jedoch nicht beeinflusst.

Eine Wiederholung des phänotypischen Assays beider Isolate, sowie die Sequenzierung des gesamten Polymerase-ORFs wären durchaus interessant. Die ermittelten Fitnesswerte der Varianten dieser Gruppe sind sehr heterogen und lassen keine Schlussfolgerungen zu. Bis auf P1 sind jedoch alle Werte deutlich niedriger als bei dem eingesetzten Wildtyp.

5.7.2 Isolate mit der Primärmutation rtM204V

Die Mutation rtM204V ist eine der beiden häufigsten und bedeutendsten Veränderungen des RT-Bereichs bei einer Lamivudin-Resistenz. Dieser Aminosäureaustausch liegt direkt im YMDD-Motiv der reversen Transkriptase, welches das aktive Zentrum des Enzyms darstellt. Meist ist diese Primärmutation mit der Sekundärmutation rtL180M assoziiert und seltener mit einem Austausch an Position 80 der RT (Warner et al. 2007). Die in dieser

Arbeit sequenzierten und untersuchten Patientenisolat der Gruppe tragen alle ausnahmslos mindestens die Mutation rtL180M zusätzlich zur Primärmutation und können damit die Beobachtungen zur Häufigkeit dieser Kombination grundsätzlich bestätigen.

Der Austausch des Methionins mit Valin im aktiven Zentrum führt zu einer sehr hohen Resistenz gegen Lamivudin, die immer auch klinische Bedeutung hat (Ghany und Liang 2007, Zoulim und Locarnini 2009). Diese bereits publizierten Beobachtungen lassen sich uneingeschränkt bei den getesteten Patientenisolaten dieser Gruppe bestätigen. Alle Virusvarianten zeigen die höchste messbare Lamivudin-Resistenz. Eine mittlere Resistenz gegen Entecavir ist laut Literatur bei dieser Mutation ebenfalls zu erwarten (Ghany und Liang 2007) und wird durch die Mutationen rtL180M und rtV173L noch erhöht. (Villet et al. 2007). Diese mittlere Resistenz ist bei 6 von 7 Isolat mit der Kombination 180M,204V festzustellen, während P12 keine signifikante Entecavir-Resistenz aufweist. Dieses Patientenisolat entspricht damit nicht dem typischen Resistenzmuster. Da der Resistenzfaktor im Vergleich zu den anderen getesteten Isolat um mindestens Faktor 5 geringer liegt, ist das Ergebnis nicht durch Messschwankungen zu erklären und eher ein Hinweis auf noch unbekannte Einflussfaktoren bezüglich der Entecavir-Resistenz. Die Beobachtung, dass eine zusätzliche Mutation an Position 173 die Entecavir-Resistenz noch verstärkt (Villet et al. 2007) kann hier nicht bestätigt werden. Nur eine von 5 Varianten mit diesem Mutationsmuster (P16) weist eine erhöhte Resistenz auf, während die anderen vier Isolate sogar eine leicht geringere Resistenz gegen Entecavir besitzen und P14 mit einem Resistenzfaktor von 2,9 keine signifikante Resistenz aufweist. Auch in diesem Fall wird deutlich, dass weitere Faktoren für die Resistenzbildung eine Rolle spielen müssen. Ein besonderes Mutationsmuster besitzt P13, das mit 80V, 180M und 215S gleich drei zusätzliche Mutationen aufweist, die mit einer Lamivudin-Resistenz in Verbindung gebracht werden (Zoulim und Locarnini 2009). Die Mutation Q215S steht dabei zusätzlich im ebenfalls in Verdacht eine Adefovir-Resistenz als Sekundärmutation zu unterstützen, sowie eine mittlere Resistenz zu verursachen (Ghany und Liang 2007). Ob die Anzahl an Sekundärmutationen bei diesem Isolat auch zu der beobachteten erhöhten Entecavir-Resistenz beiträgt bleibt offen.

Besonders interessant sind die ermittelten Resistenzen der Gruppe bezüglich Adefovir und Tenofovir. Tatsächlich konnte nur bei 2 von 13 Isolat gar keine Resistenz gegenüber mindestens einem der beiden Mittel festgestellt werden. Insgesamt 6 von 13 Isolat zeigen eine signifikante Resistenz gegenüber Adefovir, während 4 eine signifikante und 6 weitere eine tendenzielle Tenofovir-Resistenz zeigen. Diese Ergebnisse wurden in bisherigen Publikationen noch nicht gezeigt. Aufgrund des häufigen Auftretens und der signifikanten Resistenzfaktoren sind die Messungen jedoch überzeugend und erfordern weitere Beachtung. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Fitness der

Varianten des Genotyps A mit dem Mutationsmuster 180M, 204V so fällt auf, dass die Isolate mit der niedrigsten Resistenz gegenüber Adefovir und Tenofovir (P7 und P8) auch die höchsten Fitnesswerte aufweisen. Isolate, die höhere Resistenzen gegen Adefovir und Tenofovir zeigen, weisen hingegen die niedrigsten Fitnesswerte auf (P11 und P12). Aus diesen Beobachtungen könnte man schließen, dass auf der Grundlage des Mutationsmusters weitere Mutationen die Varianten entweder auf eine bessere Lamivudin-Resistenz durch erhöhte Fitness oder auf eine bessere Resistenz gegen Alkylphosphonate durch erhöhte Resistenzfaktoren hinleiten. Diese Annahmen sind allerdings rein hypothetisch.

In der klinischen Praxis wurde gezeigt, dass etwa 20% der Patienten mit lamivudinresistenten Virusvarianten nicht auf eine Adefovirtherapie ansprechen (Lee et al. 2006). Die Beobachtung konnte bisher mit der Mutation rtA181V erklärt werden, die sowohl eine Primämutaton für Adefovir-Resistenz als auch für eine mittlere Lamivudin-Resistenz darstellt (Zoulim und Locarnini 2009). Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wäre eine weitere Begründung über eine Kreuzresistenz zu Adefovir durch das typische Lamivudin-Resistenzmuster 180M,204V denkbar.

Bezüglich der Fitness ist auffällig, dass die Varianten mit der zusätzlichen Mutation 173L (P14 bis P18) eine durchschnittlich stärker verringerte Fitness aufweisen als Varianten ohne diese Mutation (bezogen auf Genotyp A). Diese Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch mit den Resultaten von Villet et al. (2007) die eine Erhöhung der viralen Fitness mit dieser Mutation in Verbindung bringen. Zieht man allerdings in Betracht, dass bei Villet et al. die intrazellulären Genomäquivalente bestimmt wurden, während in der vorliegenden Arbeit die extrazellulären Genomäquivalente detektiert wurden, lassen sich die deutlichen Unterschiede am ehesten durch eine verringerte Sekretion dieser Virusvarianten erklären. Hierbei ist zu beachten, dass die Mutation V173L aufgrund der überlappenden Leserahmen unweigerlich zur Mutation E164D im HBsAg des Virus führt. Die Mutation E164D wurde bereits mit einer reduzierten Antigenität in Verbindung gebracht (Torresi et al. 2002). Es stellt sich dadurch die Frage, ob auch die Sekretion der entsprechenden Virusvariante beeinflusst wird. Es gilt allerdings, diese Vermutung durch gleichzeitiges Messen der intra- und extrazellulären GE und dem Vergleich mit einem Wildtyp zu bestätigen. Bei dieser Überlegung muss außerdem in Betracht gezogen werden, dass bei den hier verwendeten HuH7-Zellen (die auch in den Publikationen zum Einsatz kamen) ein recht großer Teil der Viren bereits ohne Umhüllung als nackte Core-Partikel über einen alternativen Pathway die Zellen verlässt (Bardens et al. 2010). Auch wenn die hier postulierte Bedeutung der Mutation 173L nicht zutreffen sollte, lässt die sehr niedrige Fitness von 5 Patientenisolaten mit der betreffenden Mutation (P14 bis P18) doch Zweifel an der bisher zugeordneten Bedeutung als kompensatorische Mutation aufkommen.

Generell lässt sich zu den Isolaten der gesamten Gruppe mit M204V sagen, dass eine größere Heterogenität bezüglich der Adefovir-, Entecavir- und Tenofovir-Resistenzen besteht als mit den bisher formulierten Resistenzmodellen erklärbar ist. Es ist anzunehmen, dass diese Diversität auch auf die Resistenz gegenüber Lamivudin zutrifft aber durch den verwendeten Konzentrationsbereich des Assays nicht gemessen werden kann. Die deutlichen Resistenzwerte gegenüber Adefovir und Tenofovir sind genauso unerwartet, wie die nicht durch 173L erhöhte Entecavir-Resistenz und die niedrige Fitness.

5.7.3 Isolate mit der Primärmutation rtM204I

Der Austausch des Methionins mit Isoleucin im aktiven Zentrum der RT stellt die zweite bedeutende Mutation dar, die eine klinisch relevante Lamivudin-Resistenz hervorruft. Diese Mutation wird selten in Verbindung mit der Sekundärmutation rtL180M und umso häufiger mit der Sekundärmutation rtL80I/V gefunden (Warner et al. 2007), was durch die charakterisierten Isolate nur bestätigt werden kann. Auffällig bei den Isolaten dieser Gruppe ist, dass P19 bis P24 keinerlei signifikante Resistenzen gegen Alkylphosphonate, aber mittlere Entecavir- und hohe Lamivudin-Resistenzen aufweisen. Sie entsprechen damit komplett der Theorie, die den bisher publizierten Erkenntnissen zugrunde liegt (Zoulim und Locarnini 2009, Ghany und Liang 2007). Diese Beobachtung ist besonders deshalb interessant, weil sie die Signifikanz der andersartigen Ergebnisse bei der Gruppe mit rtM204V noch einmal unterstreicht. Alle Varianten des Genotyps D mit dem Mutationsmuster 80I/V, 204I zeigen mit etwa 50% des Wildtyps eine recht hohe Fitness, welche die Funktion einer Mutation an Stelle 80 als Kompensationsmutation bestätigt (Warner et al. 2007). Hier fällt auf, dass P26, im Gegensatz zu den Isolaten aus der vorherigen Gruppe, trotz 173L eine sehr hohe Fitness aufweist. Diese Variante hat neben der erwähnten Mutation E164D allerdings noch weitere Veränderungen im Oberflächen-ORF, die den Effekt aufheben könnten (siehe Anhang). Es ist zum Beispiel die bekannte Escape-Mutation P120S zu finden. Dies sind allerdings reine Spekulationen.

Betrachtet man die Isolate, welche nicht das typische Muster 80I/V, 204I tragen, sind wieder eine höhere Diversität und einige Abweichungen zu den bisherigen Berichten zu beobachten. So zeigt P25 mit den Mutationen 173L, 204I eine erhöhte Resistenz gegen Entecavir sowie gegen Adefovir und tendenziell auch gegen Tenofovir, bei einer verringerten Fitness, während P26 mit den Mutationen 80V;173L, 204I eine erhöhte Entecavir-Resistenz bei erhöhter Fitness aufweist, ohne dabei Resistenzen gegenüber Alkylphosphonate zu zeigen. Diese Unterschiede lassen wieder auf unterschiedliche Mutationswege schließen, wie sie bereits in Punkt 5.5.2 erläutert wurden. Da von diesen Mutationsmustern jedoch jeweils nur ein Isolat vorhanden ist, lassen sich keine verallgemeinerungsfähigen Aussagen treffen. Ebenfalls zu erwähnen ist, dass sich die großen Unterschiede bei der Entecavir-Resistenz (Resistenzfaktor 4,2

bis 76) bei den Varianten mit einer Mutation an Stelle 80 und rtM204I nicht allein durch Messschwankungen erklären lassen. Diese großen Unterschiede konnten bei dem Mutationsmuster rtL180M, rtM204V generell nicht festgestellt werden und können nicht allein auf die bekannten Mutationen zurückgeführt werden.

5.7.4 Patienten isolate mit Entecavir-Resistenzmustern

Bisher wurden deutliche Entecavir-Resistenzen nur in Verbindung mit dem typischen Lamivudin-Resistenzmuster rtL180M, rtM204V und mindestens einer zusätzlichen Mutation gefunden (Zoulim und Locarnini 2009, Villet 2007). Dabei spielen als Drittmutation vor allem Veränderungen an den Stellen 184, 202 und 250 eine Rolle, während die Mutationen an den Stellen 169 und 173 eine unterstützende Rolle spielen und ohne weitere Mutationen keinen Effekt auf die Entecavir-Resistenz haben. Die Mutation M250V führt zudem auch als alleinige Mutation zu einer geringen Entecavir-Resistenz von etwa Faktor 10 (Shaw et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Varianten gefunden die neben 180M,204V die Mutation 184A aufweisen und eine Variante mit der Mutation 202G. P31 und 32 zeigen zusätzlich die Mutation 173A. Bei P29,P30 und P31 konnten tatsächlich die höchsten gemessenen Entecavir-Resistenzen dieser Arbeit gefunden werden, womit die bisherigen Erkenntnisse bestätigt werden. Besonders hoch ist dabei die Resistenz bei P30, die mit der Mutation 202G in Verbindung gebracht werden kann und damit ebenfalls vorhandene Publikationen stützt (Villet et al. 2007). P30 zeigt allerdings auch signifikant erhöhte Resistenzen sowohl gegen Adefovir als auch gegen Tenofovir, die mit den aufgeführten Mutationen wiederum nicht erklärbar sind. Auch P31 zeigt bezüglich der beiden Inhibitoren erhöhte Resistenzen. Einen für das gegebene Resistenzmuster besonders niedrigen Resistenzfaktor zeigt P32. Dieses Isolat fällt damit deutlich aus dem Rahmen. Insgesamt können anhand der Isolate zwar tendenziell die bekannten Resistenzmuster bestätigt werden, aber die signifikanten Resistenzen gegen Alkylphosphonate bei P30 und P31 sowie die zu geringe Entecavir-Resistenz bei P32 zeigen auf, dass noch kein vollständiges Bild bezüglich der HBV-Resistenzbildung besteht.

Die Fitness aller vier Isolate ist auffälligerweise trotz der großen Unterschiede in den Resistenzprofilen mit rund 20% recht einheitlich.

5.7.5 Patienten isolate mit Adefovir-Resistenzmustern

Die Primärmutationen rtA181T/V und rtN236T wurden mit einer klinisch relevanten Resistenz gegen Adefovir in Verbindung gebracht. Es ist bekannt, dass beide Mutation jeweils nur einen geringen Resistenzfaktor gegen Adefovir in Höhe von etwa 3 bis 10 und teilweise eine Kreuzresistenz gegen Tenofovir verursachen (Zoulim und Locarnini 2009, Ghany und Liang 2007, Locarnini et al. 2004). Die Kreuzresistenz mit Tenofovir ist wahrscheinlich mit der großen Strukturähnlichkeit beider Mittel zu erklären. Da bereits diese sehr geringen Resistenzfaktoren bei Adefovir eine klinische Relevanz haben, lässt sich der

Cut-Off des hier entwickelten in vitro Assays mit dem klinischen Cut-Off gleichsetzen. Bei 8 von 9 untersuchten Varianten, die mindestens eine der beiden Mutationen aufweisen, konnte eine signifikante Adefovir-Resistenz nachgewiesen werden und bei einer Variante (P36) besteht mit einem Resistenzfaktor von 2,8 ein deutliches Indiz für eine Resistenz (Tabelle 17). Der entwickelte Resistenztest kann somit in den meisten Fällen auch bei Adefovir-Resistenzen einen zuverlässigen und eindeutigen Nachweis trotz geringer Resistenzfaktoren erbringen. Mit 7 von 9 Varianten, die ebenfalls eine signifikante Tenofovir-Resistenz aufweisen, kann die Theorie zur Kreuzresistenz beider Mittel weitestgehend bestätigt werden. Diese Ergebnisse sind in Hinsicht auf die klinische Praxis interessant, da sie die Behandlung von Patienten mit Tenofovir nach Resistenzentwicklung unter Adefovirtherapie als suboptimal erscheinen lassen. Eine über 5 Jahre durchgeführte retrospektive Studie zeigte tatsächlich ein signifikant vermindertes Ansprechen von adefovirresistenten Patienten auf die Tenofovirtherapie (van Bömmel et al. 2010).

Die Isolate mit der Mutation rtA181V zeigen etwa um die Hälfte geringere Resistenzfaktoren als die Isolate mit der Mutation N236T, bezüglich der Adefovir-Resistenz und bestätigen damit bereits gemachte Beobachtungen. Das gleiche gilt für die Lamivudin-Resistenz von Faktor 10 bei rt181V, sowie den additiven Resistenzeffekt durch Kombination beider Mutationen, wie es bei P40 der Fall ist (Angus et al. 2003, Ghany und Liang 2007). Lässt man den Sonderfall FvB150-1 außer acht, zeigen die Isolate jeweils keinerlei Resistenz gegen Entecavir, was die Ergebnisse bisheriger Berichte unterstützt (Zoulim und Locarnini 2009) und die Genauigkeit des entwickelten Tests unterstreicht. P35 besitzt neben 181V die zusätzliche Mutation Q215S, die als Sekundärmutation bei Adefovir-Resistenz angesehen wird und kompensatorische Funktionen bezüglich der Fitness sowie einen mittleren Einfluss auf die Adefovir-Resistenz haben soll (Ghany und Liang 2007). Das Isolat zeigt jedoch keine erhöhte Adefovir-Resistenz und die Fitness ist mit 13,9% sogar niedriger als bei den Isolaten ohne Q215S. Über die Auswirkungen der Mutation lassen sich daher keine genauen Aussagen treffen.

Insgesamt zeigen alle Patientenisolat der Gruppe (außer P41 und P42) Resistenzprofile, die sehr gut mit den bisherigen Erkenntnissen übereinstimmen und erklärt werden können. Bei den zuvor festgestellten hohen Adefovir- und/oder Tenofovir-Resistenzen anderer mit Lamivudin in Verbindung gebrachter Resistenzmuster (rtL180M, M204V) stellt sich jedoch unweigerlich die Frage, weshalb nur die in Tabelle 17 zusammengefassten Resistenzmutationen mit klinisch relevanten Ausprägungen bezüglich Adefovir in Verbindung gebracht wurden. Betrachtet man die Fitness der Varianten, so ist festzustellen, dass sowohl einige Isolate mit 181V (P33 mit 143,4%, P34 mit 79,8%) als auch mit 236T (P38 mit 59,4%), sowie das Isolat P40 (62%) mit beiden Mutationen deutlich höhere Fitnesswerte aufweisen als Varianten mit anderen Resistenzmustern und signifikanten Adefovir-Resistenzen. Hier liegen

die höchsten Fitnesswerte bei etwa 25 % (P30, P10), aber meist darunter. Da bereits geringe Resistenzfaktoren von etwa 3 eine beobachtbare klinische Resistenz zu verursachen scheinen, ist eine höhere Resistenz auf Kosten der Fitness des Virus nachteilig für die Selektion der entsprechenden Variante. Demnach würden Resistenzen über Mutationsmuster mit 180M, 204V unter Adefovirtherapie zwar initial auftreten können aber wahrscheinlich nach kurzer Zeit durch die replikationsfähigeren Varianten mit 181V und/oder 236T verdrängt werden. Zudem zeigt P40 nicht nur eine höhere Fitness, sondern auch eine höhere Resistenz als alle anderen Varianten gegenüber Adefovir.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass innerhalb einer Zelle mehrere Virusvarianten in Form der cccDNA koexistieren können. Die eventuell gegenüber Adefovir resistente reverse Transkriptase der Variante 180M,204V könnte dabei die reverse Transkription eines koexistierenden Wildtyps und somit die separate Entstehung der Varianten 181V oder 236T begünstigen.

Einen Sonderfall stellt der Klon FvB-150-1 dar, welcher aufgrund des besonders auffälligen Resistenzprofils zur Bestätigung wiederholt in den Assay eingesetzt wurde und deshalb zwei Nummerierungen erhielt (P41 und P42). Dabei sind jeweils sehr hohe aber auch recht unterschiedliche Resistenzen festgestellt worden. Diese Unterschiede sind auf zwei Gründe zurückzuführen. Zum einen zeigte die Variante außergewöhnlich hohe Standardabweichungen bei den ermittelten Messwerten innerhalb eines Versuchs, die nicht repräsentativ für den Resistenztest sind. Zum anderen lagen die Werte der IC_{50} von Adefovir, Lamivudin und Tenofovir jeweils am Rande des Messbereichs und konnten deshalb mit der linearen Regression nur anhand von zwei Datenpunkten und damit recht unzuverlässig ermittelt werden. Dieses Isolat zeigt die höchsten jemals festgestellten Werte bezüglich der Resistenz gegen Alkylphosphonate, sowie eine mittlere Resistenz gegen Entecavir, ohne eine dafür verantwortliche bekannte Mutation zu besitzen. Wenn eine Resistenz von Faktor drei bei Adefovir bereits klinische Relevanz hat und Tenofovir bei ähnlicher Wirksamkeit mit etwa 25facher Konzentration eingesetzt werden kann, so dürfte das Isolat mit einem ungefähren Resistenzfaktor von 50 an der Grenze zur klinischen Tenofovir-Resistenz liegen. Auch die Lamivudin-Resistenz ist außergewöhnlich hoch aber hier am unsichersten festgestellt worden (siehe Abbildung 34, Standardabweichungen bei Lamivudin).

Die Variante wurde in der Masterarbeit von Pia Seiz (Seiz 2011) ausführlich charakterisiert, weshalb sie an dieser Stelle nicht näher diskutiert wird. Zu beachten ist jedoch, dass die Ergebnisse der Masterarbeit einen Einfluss von Mutationen außerhalb des RT-Bereichs für die Resistenzbildung der Variante zeigen konnten und die hohen Resistenzfaktoren bestätigt wurden. Die klinischen Daten des Patienten mit der entsprechenden Variante zeigen außerdem ein stark verzögertes Ansprechen auf die Tenofovirtherapie. Erst nach einem Behandlungszeitraum von über drei Jahren konnte die Viruslast

unter die Detektionsgrenze gebracht werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten unterstützen die in vitro erhaltenen Ergebnisse.

5.7.6 Patientenisolat mit kombinierten Primärmutationen

Zwei Patientenisolat konnten aufgrund der hier verwendeten Einteilung keiner der Gruppen zugeordnet werden und sind deshalb gesondert aufgeführt. Sie besitzen jeweils die Mutationen rtL180M, rtA181V, rtM204V und sollten damit eine komplette Lamivudin-Resistenz, mittlere Entecavir-Resistenz (180M,204V) und ebenfalls eine Adefovir-Resistenz (181V) zeigen. Die signifikante Adefovir-Resistenz konnte jedoch bei beiden Isolat nicht nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Mutationen 180M und/oder 204V einen antagonistischen Effekt auf die durch 181V ausgeübte Adefovir-Resistenz ausüben. Es ist davon auszugehen, dass neben den bereits beschriebenen additiven Effekten der einzelnen Mutationen (Zoulim und Locarnini 2009), besonders bezüglich der sich aufbauenden Entecavir-Resistenz (Villet et al. 2007), auch antagonistische Effekte existieren können.

Wahrscheinlich hat sich bei den hier gezeigten Isolat erst die Mutation 181V unter Lamivudin-Resistenz entwickelt und auf Grundlage dieser Variante kamen später die anderen beiden Mutationen hinzu. Die umgekehrte Reihenfolge ist eher unwahrscheinlich, da der geringe Gewinn an Resistenz gegen Lamivudin durch 181V bei bereits vorhandener Lamivudin-Resistenz keine Rolle spielen würde und eine Adefovir-Resistenz anscheinend dadurch nicht ausgebildet wird.

5.7.7 Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Daten

Grundsätzlich können die gewonnenen Daten aus den 42 Patientenisolat und den 10 Wildtypmessungen (~3700 Messwerte) die Ergebnisse der bisher existierenden Publikationen zur Resistenzbildung bei HBV weitgehend bestätigen (Zoulim und Locarnini 2009, Ghany und Liang 2007). Von den 42 charakterisierten Patientenisolat zeigen 40 den entsprechenden Phänotyp bezüglich der Inhibitoren gegen die sie eine Resistenzmutation entwickelt haben. Eine Ausnahme bilden dabei nur P36, das mit einem Resistenzfaktor von 2,8 jedoch nahe an der festgelegten Grenze zur Signifikanz liegt, sowie P1 bei dem eine noch unbekannte Primärmutation vermutet wird. Die Wirksamkeit der verschiedenen Mittel relativ zueinander, sowie die ermittelten absoluten IC₅₀ stehen ebenfalls in Einklang mit zuvor gewonnenen Erkenntnissen (Villet et al. 2007, Langley et al. 2007). Es bestehen jedoch auch viele Unterschiede zu den bisherigen Berichten. Viele Patientenisolat zeigten in der vorliegenden Arbeit signifikante Resistenzen gegen Inhibitoren, bei denen aufgrund der Sequenz keine Resistenz bestehen dürfte. Einige Patientenisolat zeigen außergewöhnlich niedrige und andere außergewöhnlich hohe Resistenzfaktoren. Insgesamt besteht eine deutlich höhere Diversität als mit den bisherigen bekannten Mutationen zu erklären wäre. Auch bestehen phänotypische Unterschiede, die nicht allein auf den im sequenzierten RT-

Bereich liegenden Sequenzunterschieden beruhen können. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht besonders überraschend, da bisherige *in vitro* Untersuchungen sich entweder auf nur sehr kleine Patientenzahlen beschränkten (Durantel et al. 2004, Yang et al. 2004, Villet et al. 2007) oder die bekannten Mutationen durch Mutagenese in einen Wildtyp eingebaut wurden (Langley et al. 2006, Schildgen et al. 2006), wodurch alle anderen Sequenzunterschiede nicht berücksichtigt werden konnten. Bisherige Untersuchungen haben sich zusätzlich meist auf Veränderungen innerhalb des RT-Bereichs und besonders auf den Bereich der katalytischen Subdomänen A bis E (Aminosäuren 75 bis 257) beschränkt, um Resistenzen zu erklären. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich dagegen nicht auf die experimentelle Bestätigung der klinisch beobachteten Resistenzen, sondern versucht ein Gesamtbild der phänotypischen Ausprägung zu entwerfen. Aus dem generierten Datensatz, bei dem jeweils die komplette Polymerase des Patienten kloniert wurde, geht hervor, dass die Resistenzbildung wahrscheinlich wesentlich komplexer als angenommen ist und noch lange nicht alle Resistenz-bildenden Faktoren bekannt sind. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich nicht um ein einzelnes Enzym sondern um einen Komplex der neben der RT-Domäne noch drei weitere Bereiche besitzt, die verschiedenste Funktionen während der Replikation des Virus erfüllen. Mutationen in diesen Bereichen des Proteinkomplexes könnten sich direkt oder indirekt auf die RT-Domäne auswirken. Auf der Grundlage des Patientenisolates FvB150-1 konnte in der Masterarbeit von Pia Seiz gezeigt werden, dass auch Mutationen außerhalb des RT-Bereichs entscheidende Einflüsse auf die Resistenz ausüben können. Ebenfalls stützend sind die kürzlich erzielten Erkenntnisse bei HIV, welches auch eine reverse Transkriptase besitzt und mit dem HBV verwandt ist. Hier wurde *in vitro* gezeigt, dass auch Veränderungen außerhalb der Polymerasedomäne eine Resistenz gegenüber RT-Inhibitoren verursachen können. Diese Mutationen konnten zum Beispiel in der RNase H-Domäne von HIV gefunden werden und bilden zusammen mit den in der RT-Domäne liegenden Resistenzmutationen ein komplexes Resistenzmuster (Lengruber et al. 2011).

Um ein klareres und eindeutigeres Gesamtbild entwerfen zu können, muss der hier entwickelte Resistenztest auf eine deutlich größere Zahl von Patientenisolaten sowie auf die Betrachtung der Sequenzen des kompletten Polymerasebereichs ausgeweitet werden. Eine genauere Untersuchung einzelner Isolate mit besonders auffälligen Resistenzmustern (z. Bsp.: P1, P12, P16, P25, P30, P32, P41) dürfte ebenfalls zu einem entscheidenden Erkenntnisgewinn beitragen.

Der entwickelte Resistenztest könnte durch methodisch einfache Erweiterungen ein noch größeres phänotypisches Gesamtbild offenbaren. Die Quantifizierung intra- und extrazellulärer HBV-Proteine mittels eines 96-Well-Elisa-Systems wären dabei ebenso denkbar, wie die Sekretionsanalyse durch die parallele Quantifizierung intrazellulärer Genome.

5.8 Bewertung der klinisch relevanten Nukleos(t)idanaloga

Betrachtet man die zuvor gewonnenen und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, lassen sich grundlegende Aussagen über den sinnvollen Einsatz der vier klinisch relevanten Nukleos(t)idanaloga treffen.

Der Einsatz von Lamivudin zur Behandlung chronisch infizierter Patienten ist in Ländern, die andere Inhibitoren zur Verfügung haben eher als kontraproduktiv anzusehen, da die recht schnell auftretenden Resistenzmutationen (Zoulim und Locarnini 2009) die Grundlage für die Resistenzentwicklung gegen Entecavir bilden (Villet et al. 2007) und mit 181V (Zoulim und Locarnini 2009) und eventuell sogar 180M, 204V ebenfalls zu einer Adefovir-Resistenz beitragen. Ähnliches gilt auch für den Einsatz von Adefovir, welches den Boden für ein vermindertes Ansprechen gegen Tenofovir bereitet (van Bömmel et al. 2010). Die beiden Mittel sollten deshalb nur zum Einsatz kommen, wenn sie sich bei einzelnen Patienten schon jahrelang bewährt haben und die Virämie auf nicht messbare Werte gesenkt wurde oder wenn es keine Alternativen gibt.

Eine Therapie mit Entecavir ist bei behandlungsnaiven, da durch die benötigte Entwicklung von mindestens drei Resistenzmutationen eine hohe genetische Barriere besteht. Ein weiterer Vorteil ist, dass bisher noch keine Resistenzmuster bezüglich Entecavir bekannt sind, die eine Kreuzresistenz mit Tenofovir hervorrufen, obwohl die hier vorgestellten Daten erste Hinweise dafür zeigen (P30, P31).

Tenofovir ist sowohl aufgrund der bisher klinisch nicht festgestellten Resistenz als auch aufgrund der in vitro Daten und der hohen Dosierung die den Patienten verabreicht werden kann, als die optimale Behandlung zu betrachten. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass eine Resistenzentwicklung gegen Tenofovir generell unmöglich ist. Denkbar ist der schrittweise Aufbau einer Resistenz durch die Summierung verschiedener Mutationen, wie es bereits für Entecavir beobachtet wurde. Tenofovir hat wahrscheinlich die höchste genetische Barriere für eine Resistenzentwicklung, aber dürfte auch keinen absoluten Schutz vor Resistenzen bilden. Diese Vermutung wird durch die erstmals festgestellte sehr hohe Tenofovir-Resistenz eines Patientenisolats (P41 und P42) gestützt.

5.9 Bedeutung der Mutation rtI233V

Der Artikel: "Variant Hepatitis B Virus with Primary Resistance to Adefovir" beschreibt drei Patienten mit der Mutation rtI233V, die nach erfolgloser Lamivudintherapie (Patienten 2 und 3) oder nach erfolgreicher Tenofovirtherapie (Patient 1) auf Adefovir umgestellt wurden (Schildgen et al. 2006). Alle drei Patienten zeigten eine klare klinische Resistenz gegenüber Adefovir. Bei den Patienten 2 und 3 sanken die Virusmengen im Blut nicht ab, während sie bei Patient 1 stark anstiegen. Die Phase der Adefovirtherapie betrug bei allen drei Patienten etwa 30 Wochen. Anschließend wurden sie

erfolgreich mit Tenofovir behandelt. Bei der Behandlung mit Tenofovir zeigte sich bei den Patienten 2 und 3 eine schnellere Verringerung der Viruslast als bei Patient 1. Die gemessenen Viruslasten der drei Patienten unter den verschiedenen Therapien sind in der Abbildung 48 (aus dem Artikel) dargestellt.

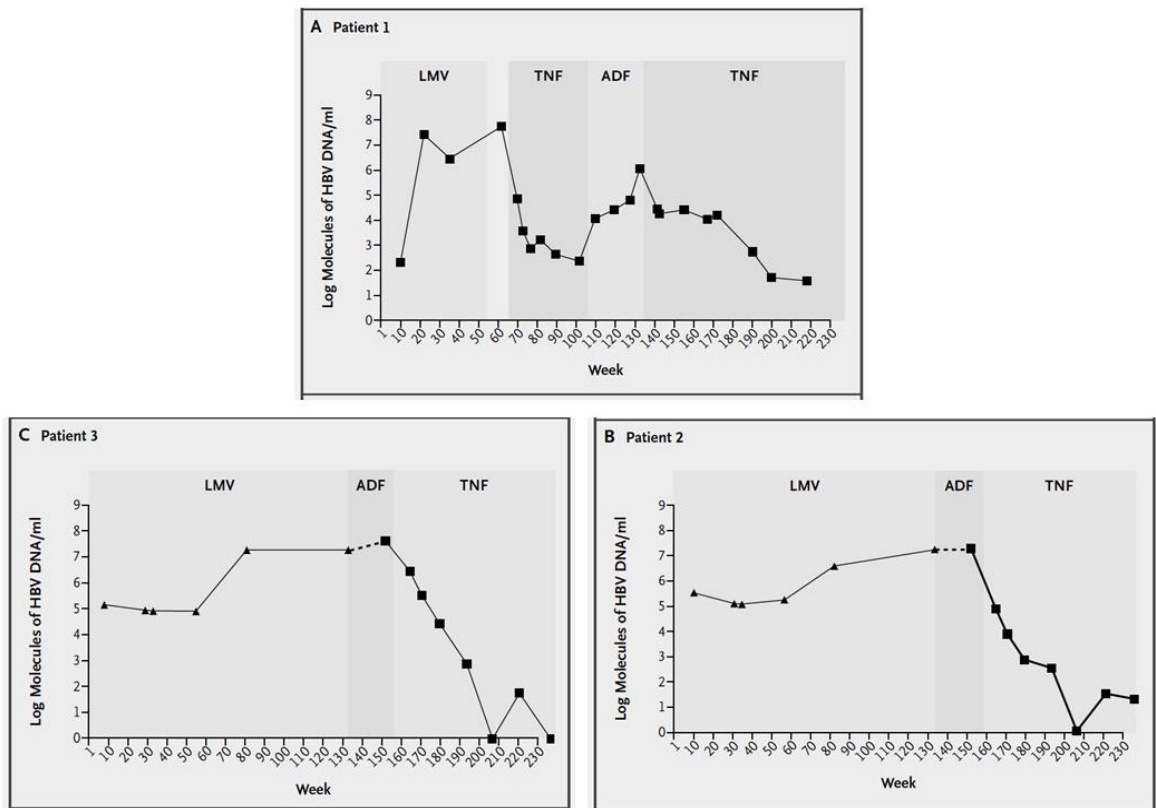


Abbildung 48: Viruslast der drei beschriebenen Patienten unter Therapie

Dargestellt sind die im Blut gemessenen GE/ml mit logarithmischer Skala gegen die Zeit in Wochen. Die Therapie zu einer bestimmten Zeit ist mit den Abkürzungen LMV für Lamivudin, ADF für Adefovir und TNF für Tenofovir gekennzeichnet und mit verschiedenen Grautönen hinterlegt. (modifiziert nach Schildgen et al. 2006)

In dem Artikel wurde zur Phänotypisierung folgender in vitro Resistenztest durchgeführt: In einen Plasmidvektor mit einem 1.3fachen Überlängenkonstrukt (Genotyp D) wurde die Mutation rt233V eingefügt. Dieses Plasmid wurde in die Zelllinie C3A transfiziert. Die Zelllinie stellt einen Subklon der Linie HepG2 dar. Die neu produzierten Viren wurden anschließend intrazellulär über Southern Blot nachgewiesen und im Überstand mittels einer nicht diskriminativen PCR über die Quantifizierung der ethidiumbromidgefärbten Gelbande. Die Untersuchung mittels Southern Blot ergab einen Resistenzfaktor von 6 und die PCR-Quantifizierung einen Resistenzfaktor von 10 gegenüber dem Wildtyp bezüglich Adefovir.

Diese Ergebnisse konnten durch andere Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. In mindestens zwei wissenschaftlichen Artikeln (Carrouee-Durantel et al. 2008, Curtis et al. 2007) wurden gegensätzliche Resultate erzielt.

Der in dieser Arbeit entwickelte Resistenztest wurde deshalb genutzt um das Ergebnis des Artikels erneut zu überprüfen. Hierbei wurde jedoch nicht die durch Mutagenese generierte Wildtypvariante mit der entsprechenden Mutation verwendet sondern es wurden Patientenisolats aus den drei im Artikel erwähnten Patienten in den Vektor pCH-3091 kloniert um die Mutation rtl233V im Kontext der ursprünglichen Sequenz untersuchen zu können. Eines der so generierten Patientenisolats wurde schließlich in den Resistenztest eingesetzt um ein Resistenzprofil zu erhalten und mit dem parallel getesteten Wildtyp vergleichen zu können. Hierzu wurde ein Isolat gewählt, welches die wenigsten Abweichungen zum verwendeten Wildtyp (innerhalb des sequenzierten Bereichs) zeigte, um die phänotypischen Daten bestmöglich mit der Mutante rtl233V assoziieren zu können. Die einzigen Unterschiede in der verwendeten Methode zu dem Resistenztest im Rahmen des HOPE-Projekts sind die Verwendung der Zelllinie HuH7, sowie anderer bei -20°C gelagerter Inhibitorstammlösungen.

Anhand der in Tabelle 21 zusammengefassten IC_{50} -Werte für den Wildtyp ist zu erkennen, dass die Werte im Vergleich zu den im HOPE-Projekt gemessenen Werten um etwa Faktor 2 bis 3 erhöht sind. Dieser Umstand ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Verwendung einer anderen Zelllinie, sowie anderer Inhibitorstammlösungen zurückzuführen. Wie groß der Einfluss welches Faktors für die IC_{50} -Abweichung ist, müsste genauer untersucht werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die ermittelten Werte unter den genannten Bedingungen zwar erhöht sind aber ebenso geringe Schwankungen aufweisen, wie die beim HOPE-Projekt generierten Werte. Diese Vermutung lässt sich durch die IC_{50} -Werte des Wildtyps aus 4.6, 4.7.2, sowie 4.8 bestätigen, deren Messung unter den gleichen Bedingungen stattfand.

Ein Resistenztest scheint also auch ohne den speziellen Subklon HuH7-München mit gleicher Genauigkeit und leicht erhöhten absoluten Werten durchführbar zu sein.

Betrachtet man die IC_{50} sowie Resistenzfaktoren des Patientenisolats in Tabelle 21, so lässt sich trotz der Mutation rtl233V keinerlei Resistenz gegen Adefovir oder einen der anderen Inhibitoren feststellen. Da der komplette Polymerase-ORF eines Originalvirus aus Patient 2 des Artikels kloniert und für die Untersuchung verwendet wurde, lässt sich mit ziemlicher Sicherheit sagen, dass die Mutation rtl233V keine Primärmutation darstellt, die eine signifikante Adefovir-Resistenz hervorruft. Eine leichte Resistenzentwicklung durch die Mutation lässt sich durch den Cut-Off des Assays (Resistenzfaktor von 3) nicht ausschließen. Für die beiden klinisch relevanten Mutationen 181V und 236T kann jedoch jeweils eine signifikante Resistenz mit dem entwickelten Test festgestellt werden. Die Bedeutung der Mutation 233V für eine Resistenzentwicklung kann deshalb bestenfalls nur als sehr gering eingeschätzt werden. Eine Erhöhung der Resistenz um den Faktor 6 bis 10, wie es in dem Artikel beschrieben wurde ist definitiv auszuschließen.

Da die drei beschriebenen Patienten jedoch alle eine Adefovir-Resistenz aufwiesen, stellt sich die Frage, wie dieser Umstand zu erklären ist. Für Patient 2 und 3 wäre die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung eine Kreuzresistenz durch die bereits vorhandenen Lamivudin-Resistenzen. Sie wären damit den 20% der Patienten zuzuordnen, die nach Lamivudin-Resistenz nicht auf eine Adefovirtherapie ansprechen (Lee et al. 2006). In Patient drei konnten zum Beispiel Klone gefunden werden (Tabelle 20), die die Mutationen 173L, 204I tragen (4 von 6). Diese Kombination kommt auch bei einem Patientenisolat aus dem HOPE-Projekt (P25) vor. Interessanterweise zeigt dieses Isolat eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber Adefovir mit einem Resistenzfaktor von 4,2. Ein Klon mit der Kombination 80V, 180M, 204I wurde ebenfalls in dem Patienten gefunden allerdings nicht mit der Häufigkeit des zuvor genannten Klons (1 von 6). Auch hier existiert ein Patientenisolat aus dem HOPE-Datensatz (P29) mit dem gleichen Resistenzmuster, welches mit einem Resistenzfaktor von 2,9 ebenfalls eine Tendenz zu einer Adefovir-Resistenz aufweist (Tabelle 15).

Bei Patient 2 konnte nur ein Klon mit relevanten Resistenzmutationen gefunden werden (80I, 204I), die in dieser Kombination jedoch normalerweise nicht zu einer Adefovir-Resistenz führen. Da es sich bei Patient 2 jedoch um den Ehemann von Patient 3 handelt ist stark davon auszugehen, dass ähnliche Virusvarianten in Form der stabilen episomalen cccDNA in den Leberzellen vorliegen und bei einem entsprechenden Selektionsdruck eine Resistenz verursachen. Dabei ist besonders zu beachten, dass sich nach nur 30 Wochen Adefovirbehandlung noch nicht die Resistenzvarianten gegenüber dem Wildtyp komplett durchgesetzt haben müssen, weshalb sie durch die Untersuchung von nur 6 Klonen auch nicht zwingend zu finden sind. Der Patient 2 war außerdem seit seiner Erkrankung mit HBV immunsupprimiert und stellt deshalb einen Sonderfall dar.

Bei Patient 1 liegt eine völlig andere Situation vor, da hier die Adefovirtherapie im Anschluss an eine erfolgreiche Tenofovirtherapie folgte. Trotz der starken Verringerung der Viruslast unter Tenofovir ist hier davon auszugehen, dass sich Virusvarianten durchgesetzt haben, die zumindest eine Teilresistenz gegenüber Tenofovir besitzen. Da dieses Mittel sehr strukturähnlich zu Adefovir ist und häufig Kreuzresistenzen bestehen ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass sich unter der Tenofovirtherapie HBV-Varianten mit einer Adefovir-Resistenz entwickelt haben. Da bereits sehr geringe Resistenzen bei Adefovir ausreichen um eine klinisch relevante Resistenz zu verursachen, könnte dies die Erklärung für die erfolglose Therapie sein. In diesem Falle müsste eine noch unbekannte Primärmutation (eventuell in Kombination mit rtI233V) für die Resistenzentwicklung verantwortlich sein. Aus dieser Überlegung heraus wäre es äußerst interessant einen Klon von Patient 1 in den phänotypischen Assay einzusetzen. Genaue Aussagen über die Gründe für die Resistenzen der einzelnen Patienten lassen sich jedoch nur schwer treffen. Eine unvollständige

oder völlig ausgebliebene Einnahme des Mittels ist ebenfalls nicht auszuschließen aber angesichts der nachfolgend sehr guten Wirkung des Tenofovirs unwahrscheinlich.

Da mit den hier erzielten Ergebnissen rtI233V als Primärmutation für eine deutliche Resistenz gegen Adefovir eindeutig ausgeschlossen werden konnte und diese Ergebnisse durch weitere Publikationen gestützt werden, sind die im Artikel erzielten Ergebnisse mit der generierten Mutante nur schwer zu erklären. Für die Quantifizierung der intrazellulären HBV-Replikation wurde der Southern Blot verwendet, welcher im Vergleich zur Real-Time PCR jedoch ungenauer ist. Die Ergebnisse des Southern Blots wurden außerdem nicht durch Mehrfachansätze gestützt. Die natürlichen Schwankungen des verwendeten Assays könnten damit zur Fehlinterpretation der erzielten Ergebnisse geführt haben.

Bei der extrazellulären Quantifizierungsmethode mittels einer nicht diskriminativen PCR zur Erstellung eines 1 kb großen Fragments und anschließenden Quantifizierung der EtBr-Gel-Bande, stellt sich neben der Linearität und Genauigkeit der ermittelten quantitativen Werte auch unweigerlich die Frage nach einer Negativkontrolle aufgrund des vorhandenen Plasmidhintergrunds aus der Transfektion (siehe 4.1.3).

5.10 Evaluierung der getesteten neuen Inhibitoren

Aufgrund der Resistenzproblematik bei dem Einsatz von RT-Inhibitoren gegen virale Erkrankungen, wird ständig nach neuen Mitteln gesucht, um die vorhandenen Therapieoptionen erweitern oder ersetzen zu können. Für diese Wirkstoffe ist es notwendig ein geeignetes in vitro Testsystem zu besitzen, um den Einfluss auf die Replikation des entsprechenden Virus evaluieren zu können. Im Falle von HBV steht mit dem hier entwickelten Hochdurchsatzverfahren ein sehr gut geeigneter Test zur Verfügung. Er bietet die Möglichkeit, in vitro die Wirkung neuer Substanzen direkt mit der Wirkung bereits klinisch verwendeter Mittel zu vergleichen. Neben dem Test neuer RT-Inhibitoren, können hierbei auch andere Wirkstoffklassen getestet werden, sofern diese Einfluss auf die Replikation des Virus nehmen.

In dieser Arbeit wurden von Herrn PD Dr. Matthes vier Inhibitoren zur Verfügung gestellt, die alle L-Nukleosidderivate darstellen und damit deutliche Strukturähnlichkeit zu Lamivudin aufweisen (Abbildung 38). Die Wirksamkeit der Mittel wurde deshalb nicht nur anhand des Wildtyps sondern auch anhand einer Variante getestet, die die typischen Lamivudin-Resistenzmutationen rtL180M, rtM204V aufweist. Die ermittelten IC₅₀-Werte (Tabelle 22) zeigen bei den vier klinisch relevanten Mitteln die zu erwartenden Ergebnisse sowohl beim Wildtyp als auch bei der Lamivudin-Resistenzvariante. Die resistente Variante zeigt dabei eine komplette Lamivudin-Resistenz, bei mittlerer Entecavir- und nicht vorhandener Adefovir- oder Tenofovir-Resistenz. Diese Ergebnisse entsprechen bisherigen Beobachtungen und zeigen erneut die Genauigkeit des Assays

(Ghany und Liang 2007). Sie bilden eine gute Grundlage um die Wirksamkeit der vier parallel getesteten neuen Inhibitoren beurteilen zu können.

Für das Mittel L-Hyd4C wurde bereits in einem anderen Testverfahren eine gute in vitro Wirkung gegenüber einer Wildtypvariante nachgewiesen (Matthes et al. 2007). Die Potenz des Mittels war dabei in etwa mit der von Lamivudin vergleichbar. Diese Wirkung kann mit den erzielten Ergebnissen klar bestätigt werden. Die IC_{50} von Lamivudin bewegt sich mit 418,1 nM nur knapp unter der von L-Hyd4C mit 641,1 nM. Die Wirksamkeit des Mittels gegenüber der Mutante ist allerdings ebenfalls mit der von Lamivudin vergleichbar. Innerhalb des jeweils gemessenen Konzentrationsbereichs lässt sich bei beiden Mitteln keine inhibitorische Wirkung nachweisen (Abbildung 40). Der tatsächliche Resistenzfaktor für das Mittel L-Hyd4C gegenüber der Mutante dürfte sich damit deutlich über dem maximal messbaren Faktor von 15,6 befinden. Sehr wahrscheinlich liegt hier eine klinisch relevante Kreuzresistenz beider Mittel vor.

Das Mittel L-Hyd4FC ist eine Variante von L-Hyd4C, die eine dem Lamivudin deutlich überlegene In-vivo Wirksamkeit besitzt (Matthes et al. 2010). In vitro ist die Wirkung beim Wildtyp jedoch um etwa Faktor 3 geringer als die von Lamivudin (Tabelle 22). Für die dennoch festgestellte hohe in vivo Wirkung, sind deshalb vermutlich Faktoren wie der zelluläre Stoffwechsel, die Aufnahme, sowie die Stabilität des Mittels verantwortlich. Auch bei diesem Inhibitor konnte wieder eine deutliche Kreuzresistenz mit Lamivudin nachgewiesen werden. Der Resistenzfaktor bezüglich der Mutante liegt dabei wahrscheinlich ebenfalls deutlich über dem maximal nachzuweisenden Faktor von 51,1. Es ist damit auch bei diesem Inhibitor eine klinisch relevante Kreuzresistenz zu vermuten.

Das zuvor noch nicht getestete Mittel L-Hy2'Fd4C zeigt bereits bei der Wildtypvariante mit 35503 nM eine sehr geringe Wirkung. Es ist unwahrscheinlich, dass einem Patienten problemlos ausreichende Konzentrationen dieses Mittels verabreicht werden könnten um eine Inhibition zu gewährleisten. Bei der getesteten Variante ist keinerlei Wirkung des Mittels mehr nachweisbar. Hier liegt wahrscheinlich ebenfalls eine deutliche Kreuzresistenz vor, die aufgrund der allgemein geringen Wirksamkeit des Mittels jedoch keine große Rolle spielt.

Das vierte Mittel (L-Hy2'Fd4FC) zeigt innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs weder bei dem Wildtyp noch bei der Mutante irgendeine nachweisbare Inhibition. Es ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit als zu wirkungslos anzusehen.

Von den vier getesteten Mitteln wären für die klinische Praxis nur die ersten beiden unter bestimmten Bedingungen interessant.

Da beide Mittel dem Lamivudin sowohl von der Struktur als auch bezüglich der Kreuzresistenz und in vitro Wirkung sehr ähnlich sind, ist ein Einsatz der Mittel in Ländern die Entecavir und/oder Tenofovir zur Therapie einsetzen können, generell nicht zu empfehlen. Nur wenn die in vivo Wirksamkeit der Mittel die von

Lamivudin nachweisbar um mehrere Größenordnungen übersteigt, wäre ein Einsatz der Mittel erneut zu überdenken.

Es besteht wie bei Lamivudin nicht nur die Gefahr einer schnellen Resistenzentwicklung, sondern auch einer vorbereitenden Resistenz gegen andere Inhibitoren.

In Ländern bei denen der Einsatz anderer Mittel als Lamivudin nicht möglich ist, wäre ein Einsatz der Inhibitoren jedoch sinnvoll, wenn sie kostengünstiger und/oder wirksamer als Lamivudin wären.

Die Auswertung der Ergebnisse unterstreicht noch einmal den Nutzen eines gut charakterisierten zuverlässigen phänotypischen Testsystems, wie es hier vorliegt.

5.11 Zelllinien mit stabilen episomalen Expressionsvektoren

Für die ausführliche und genaue Untersuchung einer bestimmten Virusvariante oder von viralen Komponenten reicht eine transiente Transfektion eukaryotischer Zellen meist nicht aus, da sowohl der Untersuchungszeitraum, also auch die Menge an hergestellten Viren oder viralen Proteinen stark limitiert sind. Eine Möglichkeit für die konstante Produktion von Viren oder viralen Proteinen ist die stabile Transfektion von Zelllinien mit einem replikationsfähigen HBV-Konstrukt oder viralen Protein-ORF und die anschließende Herstellung monoklonaler Linien durch Selektion der transfizierten Zellen mittels eines Resistenzgens. Diese Methode eignet sich gut um eine bestimmte Virusvariante in großen Mengen herzustellen, über einen langen Zeitraum zu untersuchen und Einflüsse auf die Replikation festzustellen.

Für das HBV sind besonders zwei stabile Zelllinien seit vielen Jahren in Gebrauch. Es handelt sich dabei um die Linien HepG2.2.15 (Sells et al. 1987) und HepAD38 (Ladner et al. 1997). Anhand dieser stabilen Linien wurden bereits viele Untersuchungen durchgeführt, die entscheidend zum Verständnis des HBV beigetragen haben. Die Generierung einer stabil exprimierenden Zelllinie durch Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom ist allerdings sehr aufwändig und langwierig. Ein weiterer Nachteil ist, dass aufgrund der Selektion einzelner Zellen, sowie des Einfügens der DNA an eine zufällige Stelle des Wirtsgenoms, entscheidende Eigenschaften der ursprünglichen Zelle oder des ursprünglichen Virus verändert werden können. Vorstellbar sind hier zum Beispiel der Knock-Out eines Wirtsgens durch die Insertion der viralen DNA, als auch die Beeinflussung der inserierten viralen DNA durch zelluläre Regulationselemente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb nach einer alternativen Methode zur stabilen Expression und Replikation von HBV in den bekannten Hepatomzelllinien gesucht, bei der die transfizierte DNA in episomaler Form verbleibt. Eine episomale Form des HBV würde dabei auch zusätzlich näher an der natürlichen stabilen Form des Virus liegen.

Viele Viren verwenden Strategien um ihr Genom episomal und stabil in den Wirtszellen zu halten und nutzen dabei meist die zelluläre Replikationsmaschinerie zur eigenen Replikation. Ein extremes Beispiel hierfür ist das Epstein-Barr-Virus. Dieses umhüllte DNA-Virus aus der Familie der *Herpesviridae* benötigt nur zwei Cis-Elemente (Family of Repeats (FR) und Dyad Symmetrie (DS), bilden zusammen Ori-P), sowie ein virales Protein (Epstein-Barr-Nuclear-Antigen 1, EBNA1) um episomal stabil in der Zelle zu verbleiben und bei jeder Zellteilung die zelluläre Replikationsmaschinerie zu rekrutieren (Nanbo et al. 2007). Ein Vektor, der sowohl das EBNA1-Protein rekrutiert, als auch den Ori-P besitzt, kann deshalb als autonom replizierende Sequenz angesehen werden (ARS).

Der Vektor pCEP4 (siehe 2.5) besitzt neben einer Hygromycin-Resistenzkassette die genannten Elemente und ist deshalb dazu geeignet durch Transfektion ein stabiles episomales Konstrukt in Zelllinien einzubringen, welches durch Hygromycin selektiert werden können. Damit wäre es grundsätzlich möglich, mit diesem Vektor auf schnelle und einfache Weise stabile Linien herzustellen. Die Selektion von Zellen über Hygromycin ist jedoch recht langwierig und der Selektionsgeschwindigkeit durch Puromycin deutlich unterlegen (Iwaki und Castellino 2008). Aus diesem Grunde wurde die Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors durch eine Puromycin-Resistenzkassette ersetzt. Da der Vektor mit etwa 10 Kb recht groß ist und keine einfachen Möglichkeiten bietet, die Kassetten über konventionelle Klonierung durch Restriktionsenzyme auszutauschen, wurde die Methode der ligations- und restriktionsunabhängigen In-Fusion-Klonierung verwendet.

Nach dem erfolgreichen Austausch des Selektionsgens wurde ebenfalls über In-Fusion-Klonierung das Gen des rot fluoreszierenden Proteins mCherry eingebaut. Durch das so entstandene Konstrukt konnte das System zur Erstellung stabiler Linien effektiv getestet und etabliert werden. In Abbildung 41 ist gut zu erkennen, dass die Selektion transfizierter HuH7-Zellen mit Puromycin ungewöhnlich schnell und effizient ist. Aus einer konfluenten frisch transfizierten Zellkultur kann innerhalb einer Woche eine komplett selektierte konfluente Zellkultur generiert werden. Das Protein mCherry ist dabei gut als Reporterkonstrukt geeignet, da keinerlei Hintergrundleuchten bei nicht transfizierten Zellen besteht (Abbildung 41 b). Es fällt sowohl in Abbildung 41, als auch in Abbildung 42 auf, dass nicht alle Zellen ein rotes Fluoreszenzsignal zeigen und die Stärke des Signals zwischen den Zellen einer Zellkultur starke Unterschiede aufweist.

Diese Ergebnisse sind jedoch nicht mit einer unvollständigen Selektion gleichzusetzen. Sie sind vielmehr erklärbar durch die spezielle episomale Form des Expressionskonstrukts. Konstrukte mit dem EBNA1 und dem Ori-P des EBV verhalten sich bezüglich ihrer Replikation und Verteilung auf die Tochterzellen so, wie das EBV selbst. Es konnte festgestellt werden, dass sich etwa 84% der EBV-basierten ARS einer Zellkultur bei der Zellteilung ebenfalls

erfolgreich duplizieren. Von diesen duplizierten ARS werden etwa 88% erfolgreich auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die restlichen 12% verbleiben in einer der beiden Tochterzellen (Nanbo et al. 2007). Die 16% der Zellteilungen, bei denen keine Duplikation der ARS stattfindet tragen zum generellen Verlust der episomalen Konstrukte bei, während die 12% bei denen die verdoppelten Konstrukte in einer Tochterzelle verbleiben dazu führen, dass der Pool an episomalen Konstrukten bei einem Teil der Zellen erhöht und bei einem anderen Teil erniedrigt wird. Dieser Mechanismus würde letztendlich zum Verlust des episomalen Konstrukts innerhalb der Zellkultur führen, wenn kein Selektionsdruck in Form von Puromycin vorhanden wäre.

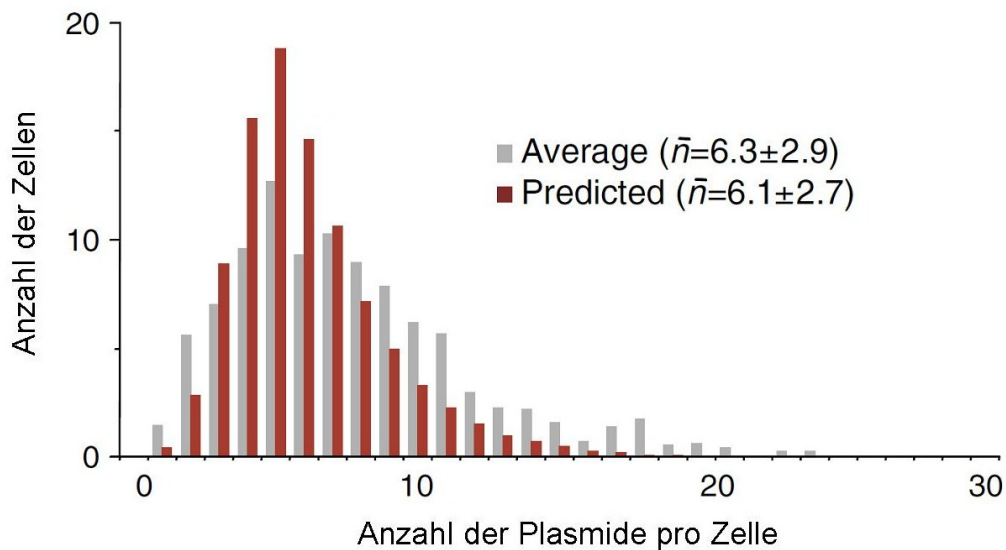


Abbildung 49: gemessene (grau) und vorherberechnete Verteilung von EBV-Genomen in transformierten B-Zellen

Ein transformierter B-Zell-Klon mit EBV-Genom wurde für über 100 Generationen kultiviert und anschließend in der S-Phase arretiert. Die einzelnen Zellen wurden auf die Menge an EBV-Genomen hin untersucht mittels FISH (graue Balken). Mittels eines Computermodells wurde die vermutliche Verteilung der Plasmide pro Zelle vorhergesagt (rote Balken), unter der Voraussetzung von 84%iger Verdopplung und 88%iger Verteilung der EBV-Genome sowie einem graduellen Verlust der Lebensfähigkeit von 4 bis 0 EBV-Plasmiden pro Zelle. Die durchschnittliche Anzahl an Plasmiden pro Zelle mit Standardabweichung ist in Klammern angegeben. (nach Nanbo et al. 2007, modifiziert).

Durch Puromycin werden alle Zellen getötet, die die kritische Anzahl an Plasmiden unterschritten haben, um eine Resistenz aufbauen zu können. Die Erhöhung und die Verringerung der Anzahl episomaler Konstrukte, sowie das Absterben der Zellen unter Selektion stehen dabei in einem ständigen Gleichgewicht. Bei Untersuchungen von durch EBV transformierten B-Lymphozyten wurden diese Beobachtungen getroffen und durch ein Computermodell bestätigt (Abbildung 49)

Nach diesem Modell gäbe es also eine große Diversität unterschiedlicher Zellen mit hoher und niedriger Anzahl an episomalen Konstrukten, wobei die

durchschnittliche Zahl konstant bleibt und direkt abhängig ist von der Konzentration des Selektionsreagenz.

Betrachtet man die Bilder aus Abbildung 41 und 42 aus diesen Gesichtspunkten, so ist anzunehmen, dass die großen Unterschiede im Expressionssignal auf unterschiedliche Mengen an episomalen Konstrukten in den Zellen zurückzuführen ist. Die anscheinend nicht leuchtenden Zellen können dabei entweder gerade komplett das episomale Konstrukt verloren haben oder zu wenige Plasmide besitzen, um über die Detektionsgrenze leuchten zu können. Da auch nach mehreren Wochen Selektion der Anteil leuchtender Zellen konstant bleibt, ist diese Erklärung viel wahrscheinlicher als eine Insertion der Resistenz des Plasmids in das Genom bei einem Teil der Zellen. Hinzu kommt, dass die Insertion mit hoher Wahrscheinlichkeit nur einen Puromycin-ORF beinhalten würde und dieser eventuell nicht ausreichen könnte um eine vollständige Resistenz zu verursachen. Es muss außerdem erwähnt werden, dass das EBNA1 die episomale Form des jeweiligen Konstrukts auf noch ungeklärte Weise aktiv erhält (Nanbo et al. 2007).

Es konnte also eine stabile episomale Transfektion etabliert werden, die eine konstante Expression des mCherry über mehrere Wochen in den Hepatomzelllinien HepG2 und HuH7 ohne Probleme erlaubt.

5.12. Erstellung einer stabilen HBV-produzierenden Hepatomzelllinie mit Hilfe eines episomalen Expressionskonstrukts

Nach der Etablierung des stabilen Transfektionssystems mit dem Reporterkonstrukt pCEP-Puro-Cherry und dem 1,1fachen Überlängenkonstrukt aus dem Vektor pCH9-3091 wurde der Vektor pCEP-Puro-3091 generiert. Er enthält das replikationsfähige Überlängenkonstrukt des Vektors pCH9-3091 anstatt des mCherry-ORFs und sollte damit nach der Transfektion von HuH7-Zellen zur Replikation des Virus und Produktion neuer Genome führen. In Abbildung 43 ist zu sehen, dass die transiente Transfektion des Vektors zur Produktion neuer Viren führt und dabei mit dem RT-Inhibitor Adefovir unterdrückt werden kann. Die ermittelte IC_{50} von 3209 nM entspricht dabei der erwarteten IC_{50} dieses HBV-Genoms unter den gegebenen Bedingungen (siehe 4.6 und 4.5). Die Menge an detektierten GE/ml im Überstand nach drei Tagen ist nur geringfügig niedriger als bei der transienten Transfektion des Plasmids pCH9-3091.

Der Vektor pCEP-Puro-3091 ist damit bezüglich der viralen Replikation voll funktionsfähig und zeigt keine Beeinflussung des Phänotyps des gut charakterisierten Wildtypgenoms aus dem Vektor pCH9-3091.

Mit Abbildung 44 wird deutlich, dass die Expression des HBV-Konstrukts stabil ist. Auch nach vier Wochen Selektion ist noch ein deutlich über dem Hintergrund liegendes und inhibierbares Signal an HBV-Genomen detektierbar.

Die Menge an detektierten Genomen ist dabei etwa um 90% geringer als bei der Messung nach der transienten Transfektion. Dieses Ergebnis ist in Hinsicht auf die episomale Form des Plasmids allerdings zu erwarten, da sich die Menge an Plasmiden nach einer gewissen Zeit auf die optimale Durchschnittsmenge unter der gegebenen Inhibitorkonzentration verringern und dann konstant bleiben wird (siehe Abbildung 49 und 42). Ob sich die Menge an Genomen tatsächlich konstant auf dem gemessenen Niveau halten wird, ist jedoch durch eine Langzeitbeobachtung der generierten Linie abzuklären.

Mit der Detektion großer Virusmengen nach 4 Wochen Selektion sowie den Beobachtungen aus 5.12 ist jedoch stark davon auszugehen, dass dieser Zustand stabil bleiben wird. Diese Form der Erstellung einer stabilen Zelllinie bietet gegenüber der Integration eines Konstrukts ins Genom enorme Vorteile.

Durch die entwickelte Methode kann innerhalb einer Woche eine stabile vollkommen selektierte HBV-produzierende Zelllinie erstellt werden. Diese Linie besteht nicht aus einem Einzelklon sondern aus einem Zellpool und kann damit die Veränderung der Zelllinie durch Klonierung von Einzelzellen umgehen. Ebenso werden Veränderungen durch Insertion des viralen Genoms in das Wirtsgenom umgangen. Die um Faktor 10 verringerte Replikation im Vergleich zur transienten Transfektion gleicht sich durch die sehr große Zellmenge aus, die in kürzester Zeit ohne großen finanziellen oder methodischen Aufwand generiert werden kann. Die hier gezeigte HBV-HuH7-Linie hätte bis zum Tag 26 mindestens um den Faktor 6000 vermehrt werden können.

Der Vektor gewährleistet damit nicht nur eine gute transiente, sowie eine schnelle stabile Transfektion, sondern kann auch als Klonierungskassette dienen um Ganzgenome oder subgenomische Fragmente aus Patientenisolaten zu klonieren. Die so erstellten Vektoren könnten dann ebenfalls in kürzester Zeit zur Herstellung der entsprechenden Zelllinien genutzt werden. Würde man das Überlängenkonstrukt in diesem Vektor unter die Kontrolle eines inhibierbaren Promoters setzen (z. Bsp: Tet-ON-System), könnte man nach der anfänglichen Replikation auf Grundlage des Episoms den Promoter abschalten, da die Rezirkulation natürlicher Genome stattgefunden haben müsste und damit unabhängig vom episomalen Konstrukt zur Virusreplikation führen sollte. Dies würde die Untersuchung des Virus unter natürlicheren Bedingungen ermöglichen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die virale Replikation unter dem natürlichen HBV-Promoter deutlich ineffektiver sein dürfte als dies unter dem CMV-Konstrukt der Fall ist (Durantel 2005).

5.13 Vektorkassetten-unabhängige Erstellung eines 1.1fachen Überlängenkonstrukts

Die Klonierung des Polymerase-ORFs zur phänotypischen Charakterisierung eines Virus stellt eine gute Möglichkeit dar, um zum Beispiel die Resistenz oder die Antigenität der Oberflächenproteine zu charakterisieren. Soll eine bestimmte

Virusvariante jedoch so authentisch wie möglich und ganzheitlich betrachtet werden oder sollen verschiedene Genotypen in Bezug auf bestimmte Eigenschaften miteinander verglichen werden, ist diese Methode nicht geeignet. Auch die Klonierung des kompletten HBV-Genoms einer Variante in eine Vektorkassette (Yang et al. 2004) führt noch zur Produktion einer Chimäre und ist damit recht artifiziell. Die Generierung und anschließende Transfektion des natürlichen HBV-Genoms ist grundsätzlich auch möglich aber nachteilig, da die Vorteile eines Vektors (Erhöhung der Transkription durch heterologen Promoter, stabile Transfektion usw.) nicht genutzt werden können.

Bisher ist nur eine einzige Methode publiziert worden, die zur Produktion eines Überlängenkonstrukts führt, das zu 100% aus der Sequenz des Patientenisolats besteht und keine künstliche Kassette benötigt (Durantel 2004). Die Nachteile dieses Systems wurden bereits ausführlich in 5.2 diskutiert.

Mit Hilfe der zuvor etablierten In-Fusion Klonierung ist es laut Herstellerangaben möglich, auch mehrerer PCR-Produkte mit einem Klonierungsschritt zielgerichtet und nahtlos in einen Vektor einzubauen. Diese Eigenschaft wurde genutzt um ein Überlängenkonstrukt aus den Virionen des Patientenserum ID309 zu generieren. In Abbildung 45 sind die wichtigsten Schritte der Herstellung des Konstrukts schematisch dargestellt. Hierbei ist besonders zu beachten, dass keinerlei Restriktionsenzyme oder Ligasen zum Einsatz kommen. Damit können alle HBV-Genome auf diese Weise kloniert werden, ohne Rücksicht auf eventuelle ungünstige Restriktionsschnittstellen nehmen zu müssen. Die verwendeten Primer zur Erstellung des Ganzgenoms sind bereits gut beschrieben und können bei fast allen HBV-Genomen genutzt werden (Günther et al. 1995). Nur bei Genotyp G muss der reverse Primer an einer Stelle angepasst werden. Die verwendeten Primer für die Erstellung der beiden Fragmente (2.5 Tabelle 5, 3.7 Tabelle 9, Abbildung 45: Nummer 3,) liegen ebenfalls in hochkonservierten Bereichen des HBV-Genoms. Sowohl die Ganzgenom-PCR als auch die PCR für die Fragmente können damit auf nahezu jedes HBV-Genom angewendet werden. Da die Klonierung komplett unabhängig von Restriktionsschnittstellen ist, kann der Vektor ebenso frei gewählt werden, wie die Insertionsstelle. Die Verschiebung der 5'- und 3'-Enden des HBV-Überlängenkonstrukts ist ebenfalls problemlos durch Verwendung alternativer Primer möglich. Dadurch können neben den 1.1fachen-Überlängenkonstrukten auch beliebige andere Längen gewählt und in einem Schritt kloniert werden.

Aus diesen Gründen ist das hier vorgestellte Klonierungssystem dem bisher bekannten System (Durantel 2004) in Hinsicht auf Flexibilität, Geschwindigkeit und Anwendbarkeit deutlich überlegen.

Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, war die Generierung des Überlängenkonstrukts aus Virionen des Patientenserums ID309 erfolgreich und führte zu einem replikationsfähigen Überlängenkonstrukt, welches in den zuvor beschriebenen pCEP-Puro-Vektor kloniert wurde. Bei der Klonierung wurden 6

Klone gepickt, welche alle das gewünschte Restriktionsmuster im Kontrollverdau zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Klonierung weist damit eine hohe Effizienz auf, die aber noch genauer untersucht werden müsste.

In Kombination mit dem pCEP-Puro-Vektor kann somit in nur 2 Wochen aus dem im Patienten befindlichen Virus eine stabile Zelllinie mit einem 100 % authentischen Überlängenkonstrukt in episomaler Form geschaffen werden.

6. Ausblick

Der in dieser Arbeit entwickelte phänotypische Test, kann neben der Evaluierung von Resistenz und Fitness im Hochdurchsatzverfahren, auch auf weitere Bereiche angewendet werden. Die Quantifizierung viraler Proteine durch Immuntests, wäre problemlos an das 96-Well Hochdurchsatzverfahren anpassbar. Neben der Quantifizierung der Viren aus dem Überstand könnten auch intrazelluläre HBV-Genome detektiert werden. Die Daten könnten zusammen mit den extrazellulär ermittelten Werten Rückschlüsse auf die Sekretion der Viren zulassen. Dieses System könnte zusätzlich durch Immunpräzipitationen im Hochdurchsatzverfahren mit dem Freedom Evo erweitert werden. Damit könnte man den Anteil umhüllter, LHBs enthaltender und damit infektiöser Viren bestimmen und mit den Wildtypwerten vergleichen. Der Vektor pCH9-3091 könnte durch pCEP-Puro-3091 ersetzt werden, welcher ermöglicht, besonders interessante Varianten, die mit dem phänotypischen Assay gefunden wurden, schnell und einfach durch stabile episomale Linien näher zu charakterisieren. Die so erstellten Linien könnten auch verwendet werden, um große Mengen der entsprechenden Viren herzustellen und diese mit Hilfe von primären Tupaia Hepatozyten oder HepaRG-Zellen auf In-vitro-Infektiosität zu testen. Die In-Fusion-Klonierungsmethode kann in diesem Zusammenhang dazu dienen, Viren bezüglich ihres kompletten eigenen Sequenzhintergrundes zu charakterisieren ohne künstliche Vektorkassetten einsetzen zu müssen. Aufgrund der kompletten Restriktionsunabhängigkeit bietet die In-Fusion-Klonierung außerdem die Möglichkeit schnell und einfach große Veränderungen im viralen Genom vorzunehmen um die Bedeutung und Funktion bestimmter viraler Proteine, Proteinbereiche oder DNA-Elemente näher zu charakterisieren. Auch die Herstellung interner Tags zur Aufreinigung viraler Proteine oder ganzer Virionen wäre problemlos umsetzbar.

Die Herstellung stabiler Linien mit 100%ig authentischen HBV-Überlängenkonstrukten oder viralen Genen wäre auch geeignet, Referenzproteine und Referenzviren für jeden einzelnen Genotyp und Subgenotyp zu entwickeln. Hier bietet sich auch der phänotypische Vergleich aller Genotypen an.

Betrachtet man die erzielten Ergebnisse der Patientenisolats des HOPE-Projekts, wäre es sinnvoll die kompletten Sequenzinformationen der Polymerasen mit der phänotypischen Ausprägung in Verbindung zu bringen um eventuell neue Erkenntnisse bezüglich anderer Polymerasebereiche als der reversen Transkriptase zu erhalten. Die klinischen Daten der entsprechenden Patienten könnten ebenfalls mit der Sequenz und dem Phänotyp korreliert werden, um ein Gesamtbild zu entwerfen. Mit den hier vorgestellten und etablierten Methoden bietet sich somit die Möglichkeit, eine große Anzahl von Patientenisolaten in Hinsicht auf verschiedenste Fragen genauer zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Weltweit sind etwa 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis B Virus (HBV) infiziert. Neben Interferon alpha stehen zur Behandlung nur Reverse Transkriptase (RT) Inhibitoren als zugelassene Arzneimittel zur Verfügung. Aufgrund der hohen Variabilität des Virus, sowie der notwendigen lebenslangen Behandlung mit RT-Inhibitoren, stellt die Entwicklung resistenter HBV-Varianten ein großes Problem dar. Bisher gab es keine effizienten und einheitlichen In-vitro-Testsysteme, um den Phänotyp von resistenten Viren bestimmen zu können. Das Verständnis der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp des HBV ist wichtig, um die Behandlung der Patienten auf Grundlage von Sequenzinformationen optimieren zu können.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojekts "Validierung eines Assays zur Bestimmung von HBV-Resistenzentwicklungen (HOPE-Projekt)" ein In-vitro-Resistenztestsystem entwickelt. Auf Grundlage des Vektors pCH9-3091, der ein replikationsfähiges HBV-Überlängenkonstrukt enthält, sowie einer speziellen diskriminativen Real-Time-PCR, konnte ein Hochdurchsatzverfahren etabliert werden, das die schnelle und genaue Charakterisierung der Resistenzprofile von Patientenisolaten ermöglicht.

Mit dem Verfahren wurden 44 Patientenisolat phänotypisch charakterisiert und die Daten dem HOPE-Projekt zur Verfügung gestellt. Anhand der Daten konnte nachgewiesen werden, dass die bisherigen Erkenntnisse zur Resistenzentwicklung nicht ausreichen, um die Diversität der Phänotypen vollständig zu erklären. Wichtigster Befund ist, dass die Resistenzen einiger der getesteter Viren nicht allein auf die bisher ausschließlich beachteten Mutationen in den katalytischen Subdomänen der RT-Domäne zurückzuführen sind, sondern wahrscheinlich auch Mutationen außerhalb dieses Bereichs einen entscheidenden Einfluss auf die Resistenzentwicklung ausüben können. Das entwickelte System konnte in leicht abgewandelter Form ebenfalls dazu verwendet werden, die früher postulierte Adefovir-Resistenzmutation rti233V genauer zu charakterisieren, sowie neu entwickelte Inhibitoren auf ihre In-vitro-Wirksamkeit, sowie Kreuzresistenz zu testen.

Neben dem Resistenztest wurde eine Methode zur schnellen und effizienten Herstellung stabiler HBV-produzierender Linien auf Grundlage eines episomalen Vektorsystems entwickelt und eine den bisher publizierten Methoden überlegene Klonierung zur Generierung von 1.1fachen Überlängenkonstrukten aus Virionen von Patientenseren ohne Vektorkassette.

8. Summary

About 350 million people are chronically infected with the Hepatitis B Virus (HBV) worldwide. Besides interferon alpha are currently only reverse transcriptase (RT) inhibitors available for therapy. Because of the high variability of the virus and the inevitable life-long treatment, the development of resistant variants is a major issue. So far no efficient and standardised in vitro test systems were available for phenotypic resistance testing. The understanding of the correlation between phenotype and genotype of HBV is important, to optimize the treatment on the basis of sequence information.

In this work an in vitro resistance test system has been developed in the context of the cooperation project: "Hepatitis B therapies optimized by phenotypic evaluation (HOPE)". On the basis of the Vector pCH9-3091, which contains a replication competent HBV-overlength construct, and a special discriminative real time PCR, a system has been established, which allows for fast and accurate characterisation of resistance profiles from patients sera. With this method 44 HBV DNA isolates from patients were characterised and the data was made available to the HOPE project. The results showed, that the previous scientific findings, concerning the development of resistance, are not sufficient to account for the diversity of the resistant phenotypes completely. The most important finding was that the resistances, of the tested viruses, did not only depend on the previously observed mutations in the catalytic subdomains of the RT-domain, but probably also on mutations outside of this region. The developed system was also used in slightly modified form to further characterise the previously postulated adefovir resistance mutation rti233V and to test the in vitro effects and the cross resistance pattern of newly developed inhibitors.

In addition to the resistance test a fast and efficient method for production of stably HBV-producing cell lines was established on the basis of an episomal vector system. Furthermore, a cloning method for the generation of 1.1 overlength products directly from patient-derived virions, without the need of a vector cassette was developed, that is superior to the methods described in literature.

9. Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., A. Fogel, et al. (1979).** *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.* Nature 282(5739): 615-6.
- Albin, C. und Robinson, W.S. (1980).** *Protein kinase activity in hepatitis B virus.* J. Virol. 34: 297-302.
- Allen, M.I., Deslauriers, M., Andrews, C.W., Tipples, G.A., Walters, K.A., Tyrell, D.L.J., Brown, N. und Condeay, L.D. (1998).** *Identification and Characterization of Mutations in Hepatitis B Virus Resistant to Lamivudine.* Hepatol. 6:1670-1677.
- Almeida, J.D., Rubenstein, D. und Scott, E.J. (1971).** *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis.* Lancet 2: 1225-7.
- 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(2):292-7.
- Arbuthnot, P. und Kew, M. (2001).** *Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma.* Int. J. Exp. Pathol. 82: 77-100.
- Bardens A, Döring T, Stieler J, Prange R. (2010).** *Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner.* Cell Microbiol. 13(4):602-19.
- Bartenschlager R, Junker-Niepmann M und Schaller H. (1990).** *The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation.* Journal of Virology 64:5324-32.
- Bartenschlager, R. and H. Schaller (1992).** *Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome.* Embo J 11(9): 3413-20.
- Bartenschlager, R. und 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.
- Baumert, T. F., R. Thimme, et al. (2007).** *Pathogenesis of hepatitis B virus infection.* World J Gastroenterol 13(1): 82-90.
- Beasley, R.P., Huang, L.-Y., Lin, C. und Chien, C. (1981).** *Hepatocellular carcinoma and HBV: a prospective study of 22707 men in Taiwan.* Lancet 2: 1129-1133.

- Beck, J. and M. Nassal (2007).** *Hepatitis B virus replication*. World J Gastroenterol 13(1): 48-64.
- 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):1-10.
- Block, T.M., Mehta, A.S., Fimmel, C.J. und Jordan, R. (2003).** *Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma*. Oncogene. 2003 Aug 11;22(33):5093-107.
- Blumberg, B.S., Alter, H.J. und Visnich, S. (1965).** *A "New" Antigen in Leukemia Sera*. The Journal of the American Medical Association 191:547-9.
- Blumberg, B.S., Gerstley, B.J., Hungerford, D.A., London, W.T und Sutnik, A.I. (1967).** *A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis*. Ann Intern Med 66: 924-31.
- Bock CT, Schranz P, Schroder CH und Zentgraf H. (1994).** *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell*. Virus genes 8:215-29.
- Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, Luo K, Wang Y, Hadziyannis S, Wolf E, McCloud P, Batrla R, Marcellin P. (2009).** *Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B*. Hepatology 49 (4): 1141-50.
- Bruss, V., Lu, X.Y., Thomssen, R. und Gerlich, W.H. (1994).** *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope protein*. EMBO J. 13:2273-2279.
- Carrouée-Durantel S, Durantel D, Werle-Lapostolle B, Pichoud C, Naesens L, Neyts J, Trépo C, Zoulim F. (2008).** *Suboptimal response to adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B in nucleoside-naïve patients is not due to pre-existing drug-resistant mutants*. Antivir Ther. 13 (3):381-8
- Chang, S. F., H. J. Netter, M. Bruns, R. Schneider, K. Frolich und H. Will (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, C.J., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., et al (2006).** *Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level*. JAMA 295: 65-73.
- Chisari, F. V. (1997).** *Cytotoxic T cells and viral hepatitis*. J Clin Invest 99(7): 1472-7.
- Chisari, F.V. und Ferrari, C. (1995).** *Hepatitis B virus immunopathogenesis*. Annu. Rev. Immunol. 13: 29-60.

- Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Sarrazin C, Dollinger MM, Schirmacher P, Dathe K, Kopp IB, Zeuzem S, Gerlich WH, Manns MP; AWMF. (2011)** *Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline*. Z Gastroenterol. 49(7):871-930. Epub 2011 Jul 11.
- Cougot, D., Neuveut, C. und Buendia M.A. (2005).** *HBV induced carcinogenesis*. J. Clin. Virol. 34: 75-78.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Böttcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. und Pumpens, P. (1994).** *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*. Cell 77(6): 943-950.
- Cullen BR, Malim MH. (1992).** *Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene*. Methods Enzymol. 216:362-8.
- Curtis M, Zhu Y, Borroto-Esoda K. (2007).** *Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir*. J Infect Dis. 196(10):1483-6
- Dane, D.S., Cameron, C.H. und Briggs, M. (1970).** *Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet: 695-8.
- De Clercq E., Holy A. (2005).** *Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs*. Nat Rev Drug Discov 4:928–940.
- Delaney, W.E. und Isom, H.C. (1998).** *Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus*. Hepatol. 28:1134-1146.
- Dryden, K. A., S. F. Wieland, et al. (2006).** *Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy*. Mol Cell 22(6): 843-50
- Durantel D, Carrouée-Durantel S, Werle-Lapostolle B, Brunelle MN, Pichoud C, Trépo C, Zoulim F. (2004).** *A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus*. Hepatology 40:855–864.
- Durantel D., Brunelle, M.N., 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. 34:34-43.
- Durantel, D. (2010).** *Fitness and infectivity of drug-resistant and cross-resistant hepatitis B virus mutants: why and how is it studied*. Antivir Ther.,15(3 Pt B):521-7.
- Engelke, M., K. Mills, et al. (2006).** *Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site*. Hepatology 43(4): 750-60.
- Epidemiologisches Bulletin, Robert-Koch-Institut Nr. 20 25.5.2010**
- Findlay G.M., MacCallum F.O. (1937).** *Note on acute hepatitis and yellow fever immunization*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 31: 297–308.

- Fu L., Cheng Y.C. (2000).** *Characterization of novel human hepatoma cell lines with stable hepatitis B virus secretion for evaluating new compounds against lamivudine- and penciclovir resistant virus.* Antimicrob Agents Chemother 44:3402-3407.
- Ganem, D. and A. M. Prince (2004).** *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.* N Engl J Med 350(11): 1118-29.
- Ganem, D. and H. E. Varmus (1987).** *The molecular biology of the hepatitis B viruses.* Annu Rev Biochem 56: 651-93.
- Gerlich WH und Robinson WS. (1980).** *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand.* Cell 21:801-9.
- Gerlich, W. H. u. S. Schaefer (2002).** *Hepadnaviren: Hepatitis B Virus.*, Thieme.
- Gerlich, W.H., Goldman, U., Müller, R., Stibbe, W. und Wolf, W. (1982).** *Specificity and localization of the hepatitis B virus- associated protein kinase.* J. Virol. 42: 761-766.
- Ghany M., Liang T.J. (2007).** *Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B.* Gastroenterology 132:1574–1585
- Girones R, Miller RH. (1989).** *Mutation rate of the hepadnavirus genome.* Virology 170(2):595-7.
- Glebe, D. und Urban, S. (2007).** *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry.* Gastroenterology 13(1): 22-38.
- Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E.V., Valerius, K.P. und Gerlich, W.H. (2003).** *Pre-S1 antigen-dependent infection of tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus.* J. Virol. 77: 9511-9521.
- Grethe S, Heckel J-O, Rietschel W und Hufert FT. (2000).** *Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Variants in Nonhuman Primates.* J. Virol. 74:5377-81.
- Günther S, Li BC, Miska S, Krüger 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(9):5437-44.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984).** *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence.* J. Virol. 52: 396-402.
- Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, L., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1990).** *Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription.* Nature 344: 552-555.

- Hruska, F.J. Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. und Robinson, W.S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after Dane particle DNA polymerase reaction.* J. Virol. 21: 666- 672.
- Hu, J. and C. Seeger (1996).** *Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase.* Proc Natl Acad Sci U S A 93(3): 1060-4.
- Hu, J., Toft, D.O. und Seeger, C. (1997).** *Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids.* Embo J. 16: 59-68.
- Huang, J. and T. J. Liang (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(12): 7476-86.
- 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(3):678-86.
- Iwaki T, Castellino FJ. (2008).** *A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection in Drosophila Schneider S2 cells expressing heterologous proteins.* Cytotechnology. 57(1):45-9
- Jaoude, G. A. and C. Sureau (2005).** *Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus.* J Virol 79(16): 10460-6.
- Junker Niepmann, M., R. Bartenschlager, et al. (1990).** *A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA.* Embo J 9(10): 3389-96.
- Kann M und Gerlich WH. (2005).** Hepatitis B, p. p. 1226-68. In B. W. J. Mahy and V. ter Meulen (ed.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed, vol. 2. , Washington, DC.
- Kann, M., B. Sodeik, et al. (1999).** *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex.* J Cell Biol 145(1): 45-55.
- Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H. und Gerin, J.L. (1976).** *Demonstration of subpopulations of Dane particles.* J. Virol. 17: 885-893.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. und Robinson, W.S. (1973).** *DNA-Polymerase associated with human hepatitis B antigen.* J Virol. 17: 885-893.
- Köck, J. and H. J. Schlicht (1993).** *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity.* J Virol 67(8): 4867-74.

- Köck, J., E. M. Borst, et al. (1996).** *Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment.* J Virol 70(9): 5827-31.
- Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G.H., Guo, J.T., Seeger, C. und King, R.W. (1997).** *Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably tranfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening po-tential inhibitors of HBV replication.* Antimicrob Agents Chemother. 41:1715- 1720.
- Lambert, C. and R. Prange (2001).** *Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation.* J Biol Chem 276(25):22265-72.
- Lambert, C., Döring, T. und Prange, R. (2007).** *Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin.* J Virol. 81(17):9050-60.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B. und Robinson, W.S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.* J. Virol. 23: 368-376.
- Lanford RE, Notvall L, Lee H, Beames B. (1997)** *Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase.* J Virol. 71(4):2996-3004.
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB und Rico-Hesse R. (1998).** *Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:5757-61.
- Langley, D.R., Walsh, A.W., Baldick, C.J., Eggers, B.J., Rose, R.E., Levin, S.M., Kapur, A.J., Colonno, R.J. und Tenney, D.J. (2007).** *Inhibition of Hepatitis B Virus Polymerase by Entecavir.* J Virol. 81:3992:4001
- Laskus T, Rakela J und Persing DH. (1994).** *The stem-loop structure of the cisencapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants.* Virology 200:809-12.
- Le Seyec, J., P. Chouteau, et al. (1999).** *Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain.* J Virol 73(3): 2052-7.
- Lee YS, Suh DJ, Lim YS, Jung SW, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Yoo W, Kim SO. (2006).** *Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy.* Hepatology. 43(6):1385-91.

Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D., (2008), *Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus.*, Cell Microbiol., 10(1):122-33.

Lengrubner 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(4):702-8

Lewin SR, Ribeiro RM, Walters T, Lau GK, Bowden S, Locarnini S, Perelson AS. (2001). *Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed.* Hepatology 34(5):1012-20.

Lien, J.M., Aldrich, C.E. und Mason, W.S. (1986). *Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis.* J. Virol. 57: 229-236.

Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky JM, Zoulim F. (2004). *Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B.* Antivir Ther. 9(5):679-93.

Lu Q. (2005). *Seamless cloning and gene fusion.* Trends Biotechnol. 23(4):199-207

Lürmann, A. (1885). *Eine Icterusepidemie.* Berl. Klin. Wochenschr. 22: 20-23.

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH und Robinson WS. (1980). *A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77:2941-5.

Marion PL, Susan S, Knight FH, Salazar H, Popper W und Robinson S. (1983). *Ground Squirrel Hepatitis Virus Infection.* Hepatology 3:519-27.

Mason WS, Seal G und Summers J. (1980). *Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.* J. Virol. 36:829-36.

Matthes E, Bünger H. (2010). *Cellular pharmacology of the anti-hepatitis B virus agent beta-L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-N4-hydroxycytidine: relevance for activation in HepG2 cells.* Antimicrob. Agents Chemother. 54(1):341-5.

Matthes E, Funk A, Krahn I, Gaertner K, von Janta-Lipinski M, Lin L, Will H, Sirma H. (2007). *Strong and selective inhibitors of hepatitis B virus replication among novel N4-hydroxy- and 5-methyl-beta-L-deoxycytidine analogues.* Antimicrob Agents Chemother 51(7):2523-30.

Matthes E, Volz T, Lütgehetmann M, Petersen J, Dandri M (2010). *Strong in vivo antiviral efficacy of a new l-deoxycytidine derivate in hepatitis b virus infected human hepatocytes repopulating the liver of upa/scid mice.* Poster presentation EASL 2010, Category 5a. VIRAL HEPATITIS: a. HEPATITIS B - EXPERIMENTAL

Miller RH und Robinson WS. (1986). *Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses.* Proc Natl Acad Sci U S A.;83(8):2531-5.

Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, Ripault MP, Castelnau C, Martinot Peignoux M, Dauvergne A, Asselah T, Boyer N, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Nicolas-Chanoine MH, Marcellin P. (2009). *Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients.* Hepatology 49(4):1151-7.

Nakabayashi, H., Taketa, T., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). *Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium.* Cancer Res., 42: 3858-3863.

Nanbo A, Sugden A, Sugden B. (2007). *The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells.* EMBO J. 26(19):4252-62

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.

Niederau C., Heintges T., Lange S., Goldman G., Niederaus C.M., Mohr L., Haussinger D. (1996). *Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B.* N Engl J Med 334: 1422–1427.

Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S. und Magnus, L.O. (2004). *Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HbsAg subtypes.* Intervirology 47(6): 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(9):4398-402.

Papavramidou, N., Fee E., Christopoulou-Aletra H. (2007). *Jaundice in the Hippocratic Corpus.* J Gastrointest Surg. 11 (12): 1728-31

Perrillo R. (2009). *Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B.* Hepatology.49(5 Suppl):S103-11.

Perrillo R.P., Schiff E.R., Davis G.L., Bodenheimer H.C. Jr., Lindsay K., Payne J., Dienstag J.L., O'Brien C., Tamburro C., Jacobson I.M. (1990). *A randomized, controlled trial of interferon alpha-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis International Therapy Group.* N. Engl. J. Med. 323: 295-301.

Perz JP, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF und Bell BP. (2006). *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.* Journal of hepatology 45:529-38.

- Prince, A.M. (1968).** *An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 60 (3): 814-821
- Qi X., Xiong S., Yang H., Miller M., Delaney W.E. (2007).** *In vitro susceptibility of adefovir associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents.* Antivir Ther. 12:355-362.
- Rabe, B., A. Vlachou, et al. (2003).** *Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome.* Proc Natl Acad Sci U S A 100(17): 9849-54.
- Rabe, B., D. Glebe, et al. (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(11): 5465-73.
- Radziwill, G., Tucker, W. und 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, L. B., D. N. Standring, et al. (1983).** *Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II.* Mol Cell Biol 3(10): 1766-73.
- Reynaud, L., Carleo, M.A., Talamo, M., Borgia, G. (2009).** *Tenofovir and its potential in the treatment of hepatitis B virus.* Ther Clin Risk Man. 5:177-185.
- Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS. (2002)** *Dynamics of hepatitis B virus infection.* Microbes Infect. 4(8):829-35.
- Robinson WS. (1977).** *The Genome of Hepatitis B Virus.* Annual Review of Microbiology 31:357-77.
- Robinson, W.S., und Greenman, R.L. (1974).** *DNA polymerase in the core of the human hepatitis B candidate.* J Virol 13: 1231-6.
- Ryu DK, Ahn BY, Ryu WS. (2010).** *Proximity between the cap and 5' epsilon stem-loop structure is critical for the suppression of pgRNA translation by the hepatitis B viral polymerase.* Virology. 406(1):56-64.
- Sattler, F. und Robinson, W.S. (1979).** *Hepatitis B viral DNA has cohesive ends.* J. Virol. 32: 226-233.
- Schaefer S, Glebe D und Gerlich WH. (2010).** *Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae).* Medizinische Virologie, 2 ed. Thieme, Stuttgart.
- Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, Helm M, Rockstroh JK, Willems WR, Will H, Gerlich WH. (2006).** *Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir.* N Engl J Med. 354(17):1807-12.

- Schmitt, S., Glebe, D., Alving, K., Tolle, T.K., Linder, M., Geyer, H., Linder, D., Peter-Katalinic, J., Gerlich, W.H. und Geyer, R. (1999).** *Analysis of the PreS2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus.* J. Biol. Chem. 274: 476-482.
- Schulze, A., P. Gripon, et al. (2007).** *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.* Hepatology 46(6): 1759-68.
- Schuster, R., Gerlich, W.H. und Schaefer, S. (2000).** *Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts.* Oncogene 19(9): 1173-1180.
- Seeger C, Maragos J. (1989).** *Molecular analysis of the function of direct repeats and a polypurine tract for plus-strand DNA priming in woodchuck hepatitis virus.* J Virol. 63(5):1907-15.
- Seeger C, Mason WS. (2000).** *Hepatitis B virus biology.* Microbiol Mol Biol Rev. 64(1):51-68.
- Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986).** *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science 232: 477-484.
- Seifer M, Zhou S und 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. 67:249-57
- Seignères, B., Pichoud, C., Martin, P., Furman, P., Trepo, C. und Zoulim, F. (2002).** *Inhibitory Activity of Dioxolane Purine Analogs on Wild-type and Lamivudine-Resistant Mutants of Hepadnaviruses.* Hepatol. 36:710-722.
- Seitz S, Urban S, Antoni C und Bottcher B. (2007).** *Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions.* The EMBO journal 26:4160-7.
- Seiz P. (2011).** *Antivirale Resistenzprofile von Hepatitis-B-Virus Mutanten in vitro.* Masterarbeit am Institut für Med. Virologie, Giessen
- Sells, M.A., Chen, M.L. und Acs, G. (1987).** *Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells tranfected with cloned hepatitis B virus DNA.* Proc Natl Acad Sci USA. 84: 1005- 1009.
- Sells, M.A., Zelent, A.Z., Shvartsman, M. und Acs, G. (1988).** *Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions.* J. Virol. 62: 2836-2844.
- Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. (2006).** *HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation.* J Hepatol. 44(3):593-606.

Sprengel R, Kaleta EF und Will H. (1988). *Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons.* J. Virol. 62:3832-39.

Sprinzl, M.F., Oberwinkler, H., Schaller, H. und Protzer, U. (2001). *Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier.* J Virol. 75:5108-5118.

Summers, J. O'Connell, A. und Millman, I. (1975). *Genome of hepatitis B virus: Restriction enzymes cleavage and strcture of DNA extracted from Dane particles.* Proc Natl Acad Sci U S A 72(11): 4597-4601.

Summers, J. und Mason, W.S. (1982). *Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell 29: 403-415.

Summers, J., J. M. Smolec, et al. (1978). *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.* Proc Natl Acad Sci U S A 75(9): 4533-7.

Tang, H., K. E. Banks, et al. (2001). *Hepatitis B virus transcription and replication.* Drug News Perspect 14(6): 325-34.

Thierfelder W, Hellenbrand W, Meisel H, Schreier E und Dortschy R. (2001). *Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998.* Eur J Epidemiol.;17(5):429-35.

Tiollais, P., Pourcel, C. und Dejean, A. (1985). *The hepatitis B virus.* Nature 317: 489-95.

Toh H, Hayashida H und Miyata T. (1983). *Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus.* Nature 305:827-9.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC. (2002). *Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy.* Virology.293(2):305-13.

Tuttleman, J.S., Pourcel, C. und 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, Hüppe D, Stein K, Trojan J, Sarrazin C, Böcher WO, Spengler U, Wasmuth HE, Reinders JG, Möller 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(1):73-80.

- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ und 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):1383-9.
- Villet, S., Ollivet, A., Pichoud, C., Barraud, L., Villeneuve, J.P., Trepo, C. Und Zoulim, F. (2007).** *Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient.* J Hepatol. 46:531-538.
- Wang, G.H. und Seeger, C. (1992).** *The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis.* Cell 71: 663-670.
- Wang, G.H. und Seeger, C. (1993).** *Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses.* J. Virol. 67: 6507-6512.
- 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(7):2285-92
- Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1994).** *Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription.* J. Virol. 68: 2994-2999.
- WHO.(2002).** *Hepatitis B*, WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2: Hepatitis B.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. und Schaller, W. (1987).** *Replication strategy of human hepatitis B virus.* J. Virol. 61: 904-911.
- Wittkop L, Schwarz A, Cassany A, Grün-Bernhard S, Delaleau M, Rabe B, Cazenave C, Gerlich W, Glebe D, Kann M. (2010)** *Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation.* Cell Microbiol. 12(7):962-75
- Wong D.K., Cheung A.M., O'Rourke K., Naylor C.D., Detsky A.S., 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, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J. und Mason, W.S. (1990).** *In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway.* Virology 259: 299-304.
- Yang H., Qi X., Sabogal A., Miller M., Xiong S., Delaney W.E. (2005).** *Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV.* Antivir Ther. 10:625-633.
- Yang, H., Westland, C., Xiong, S. und Delaney, W.E. (2004).** *In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector.* W. E. t. 61:27-36.

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. 2010 5(2):e9297.

Yu JW, Sun LJ, Yan BZ, Kang P, Zhao YH. (2011). *Lamivudine treatment is associated with improved survival in fulminant hepatitis B.* Liver Int. 31(4):499-506.

Zoulim, F. und Locarnini, S. (2009). *Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues* Gastroenterol. 5:1593-1608.

Zoulim, F., Saputelli, J. und Seeger, C. (1994). *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.* J. Virol. 68: 2026-2030.

10. Abkürzungen

α (anti-)	Antikörper gegen
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ADV	Adefovir
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
aqua bidest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ASHV	Arctic ground squirrel Hepatitis Virus
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
c	Centi-
C-	Carboxy
ca.	circa
cccDNA	covalently closed circular DNA
CO_2	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DR 1 und 2	Direct Repeat 1 und 2
DR	Direct repeat
EBV	Epstein Barr Virus
E. coli	<i>"Escherichia coli"</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
etc.	et cetera
ETV	Entecavir
evtl.	eventuell
FKS	Fötales Kälber-Serum
Fr.	Fraktion
g	Erdbeschleunigung

g	Gramm
ge	Genomäquivalente
GFP	„green fluorescent protein“
ggf	gegebenenfalls
GSHV	Ground squirrel Hepatitis B Virus
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B early Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HGM	Hepatocyte Growth Medium
HIV	Human Immunodeficiency virus
HS	Heparan Sulfat
HSPGs	Heparan Sulfat Proteoglykane
ID	Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	„Luria Bertani“
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
LMV	Lamivudin
Lsg	Lösung
m	Milli
m	Meter
M	Molarität (mol/l Lösung)
mAK	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mol	Molar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
myr	myristoyliert
n	nano
N-	Amino-
Na	Natrium
NaN ₃	Natriumacid
nm	Nanometer
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte

ORF	<i>“open reading frame”</i> (offener Leserahmen)
ori-P	origin of plasmid replication (Replikationsursprung)
p	pico
PBS	<i>“phosphate buffered saline”</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii
PTH	primäre Tupaia-Hepatozyten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SHBs	Small Hepatitis B surface protein
Tab.	Tabelle
TDF	Tenofovir
Tet	Tetracyclin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Weight/weight
WHO	World Health Organization
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Woolly monkey Hepatitis B Virus
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro-

11. Anhang

Tabelle 24: Unterschiede in der Aminosäuresequenz der getesteten Patientenisolats

Die bekannten Resistenzmutationen des RT-ORFs sind jeweils fett gedruckt.

Name des Patientenisolats	RT-ORF		HBs-ORF	
	sequenzierter Bereich in AS	Unterschiede zum Wildtyp (pCH9-3091)	sequenzierter Bereich in AS	Unterschiede zum Wildtyp (pCH9-3091)
P1: FvB-153-1	1 - 344	S78T, Y135S, V142E, A186V, V214A , N248H, I266R, Q267R	1 - 227	C69*, L109P, T127P, Y134N, P178S, V190A, Y206H, L216*
P2: FvB-161-4	12 - 270	P17R, S78T, Y135S, V142E, A186V, V214A , N248H, I266R, Q267R	4 - 227	L9V, C69*, L109P, T127P, Y134N, P178S, V190A, Y206H, L216*
P3: RK-266-2	1 - 271	I269L	1 - 227	C69Y, L175S
P4: FvB-162-1	1 - 344	E11D, N123D, M129I, N131D, N134S, K154Q, S213T, N248H	1 - 227	N3I, L21S, G44E, Q101R, C121F, T126A, S204R
P5: FvB-169-2	37 - 344	N123D, M129I, N131D, N134S, K154Q, S213T, N248H	28 - 227	N123D, M129I, N131D, N134S, K154Q, S213T, N248H
P6: FvB-166-3	93 - 344	N118T, N134D, L180M , M204V , A222T	84 - 227	L87Q, I110L, I195M, M213I
P7: FvB-165-2	28 - 264	M145L, L180M , M204V , V207I, L217R	19 - 227	Y161F, I195M, M198I, W199L, L209V
P8: FvB-154-9	1 - 344	I53V, N118T, L180M , M204V , L217R, M336L	1 - 227	I110L, I195M, L209V
P9: FvB-157-1	1 - 344	I53V, N118T, L180M , M204V , L217R, M336L	1 - 227	I110L, I195M, L209V
P10: RK-224-5	47 - 270	L180M , M204V , L217R	39 - 227	I195M, L209V
P11: RK-16-5	1 - 271	L102I, N118T, L180M , M204V , L217R	1 - 227	F93L, I110L, I195M, L209V
P12: RK-172-2	45 - 271	I53F, L180M , M204V , L217R	37 - 227	I195M, L209V
P13: RK-2-1	1 - 271	Y54H, L80V, L91I, L115V, F122L, Y135S, L180M , M204V , Q215S , Y257H, D263E, I266V, E271D	1 - 227	T127P, A166V, V184A, I195M, Y206C, S207R
P14: FvB-175-9	12 - 271	V23A, N53E, Y54H, N118D, H124Y, Y135S, S137T, Q149K, I163V, L164M, V173L , L180M , M204V , S219A, L229M, N248H	4 - 227	R24K, T45N, T127P, E164G, W182L, I195M, S210R, P214L, F220L

P15: RK-172-3	1 - 268	V173L, L180M, M204V , L217R	1 - 227	E164D, I195M, L209V
P16: FvB-172-1	1 - 271	I53V, V112L, N122T, V173L, L180M, M204V , L217R	1 - 227	M103I, T114P, E164D, I195M, S207N, L209V
P17: FvB-154-2	1 - 344	I53V, V112L, N122T, V173L, L180M, M204V , L217R, M336L	1 - 227	M103I, T114P, E164D, I195M, S207N, L209V
P18: FvB-169-4	67 - 271	V112L, N122T, V173L, L180M, M204V , L217R	58 - 227	M103I, T114P, E164D, I195M, S207N, L209V
P19: RK-16-1	56 - 270	N118T, M204I , L217R	47 - 227	I110L, W196L, L209V
P20: KW-WH2-34	27 - 271	L80I , A113T, F122L, Y135S, M204I , D263E, E271D	19 - 227	S31N, T127P, W196L
P21: FvB-170-5	1 - 270	L80I , Y135S, M204I , N248H, C256G	1 - 227	T127P, W196L, I208T, P214L
P22: FvB-158-1	1 - 344	L80V , L91I, H124Y, T128I, Y135S, M204I , N248H, I266R, V278I, K333N	1 - 227	P120S, T127P, W196L
P23: FvB-175-14	1 - 269	L80V , L91I, H124Y, T128I, Y135S, M204I , N248H, I266R	1 - 227	P120S, T127P, W196L
P24: RK-16-3	12 - 271	L80V, M204I , L217R	4 - 227	W196L, L209V
P25: RK-44	47 - 270	L91I, F122L, Y135S, V173L, M204I , V253F, D263E	39 - 227	T127P, E164D, W196L
P26: FvB-158-2	1 - 344	L80V , H124Y, T128I, Y135S, V173L, M204I , N248H, I266R, V278I, K333N	1 - 227	P120S, T127P, E164D, W196L
P27: RK-190-1	12 - 271	I53N, L80V, L180M, M204I , L217R, I254M	4 - 227	S45T, Y161F, W196L, L209V
P28: RK-182-1	1 - 301	V142T, V173L, L180M , C188S, M204I	1 - 227	M133I, Y134H, E164D, F179L, W196L
P29: FvB-147-3	1 - 344	L91I, F122I, H124Y, T128N, N131D, Y135S, L180M, T184A, M204V , N248H, I266R, T326P, A329V, C332Y	1 - 227	P120T, T127P, T189I, V194A, I195M
P30: WH-2-10-1	69 - 271	F122L, Y135S, L180M, S202G, M204V , Y257H, D263E, Q267L, E271D	61 - 227	R122K, T127P, Y134F, I195M
P31: FvB-155-1	1 - 344	L91I, F122I, H124Y, T128N, N131D, Y135S, V173A, L180M, T184A, M204V , N248H, I266R, C332Y	1 - 227	P120T, T127P, W165R, T189I, V194A, I195M
P32: FvB-147-1	1 - 344	L91I, F122I, H124Y, T128N, N131D, Y135S, V173A, L180M, T184A, M204V , N248H, I266R, C332Y	1 - 227	P120T, T127P, W165R, T189I, V194A, I195M

P33: FvB-164-7	31 - 271	H124Y, Y135S, A181V , S213T, F221L, N248H	22 - 227	Q101R, T127P, L173F, S193L, S204R
P34: FvB-172-5	1 - 271	H124Y, Y135S, A181V , S213T, F221L, N248H	1 - 227	Q101R, T127P, L173F, S193L, S204R
P35: RK-24	53 - 270	T128I, Y135S, I163V, A181V , Q215S , N248H, C256S	45 - 227	Q101R, P120S, T127P, L173F, T189I, S207R
P36: FvB-172-4	71 - 270	H124Y, Y135S, A181V , S213T, N248H	62 - 227	T127P, L173F, S193L, S204R, P214L
P37: RK-117-3	16 - 264	I53S, N122H, M129L, W153R, V163I, A181V , I253V	7 - 227	S45A, Y100C, L173F, S207N
P38: FvB-154-3	1 - 294	D7G, H35R, I53V, I121N, Y126H, S143A, S213T, L217R, N236T , H271R	1 - 227	T27A, S113T, F134L, S204R, L209V
P39: FvB-167-7	26 - 344	H35R, I53V, L66P, I121N, Y126H, S143A, S213T, L217R, N236T , H271R	18 - 227	T27A, S58L, S113T, F134L, S204R, L209V
P40: RK-162-1	12 - 271	Y54H, L91I, N123D, Y135S, A181V , N236T , N248H, I269L	4 - 227	T127P, L173F, I208T
P41/42: FvB-150-1	1 - 344	Y54H, R110G, N118T, N131D, Y135S, A181V , S219A, F221Y, N236T , N248H, C256S, K270R	1 - 227	T27I, I110L, T127P, L173F, S210R, L213I
P43: FvB-164-1	1 - 271	F122L, H124N, Q130P, N131D, L180M , A181V , M204V , D263E	1 - 227	T125M, L173F, I195M
P44: FvB-166-1	1 - 271	F122L, H124N, Q130P, N131D, L180M , A181V , M204V , D263E	1 - 227	T125M, L173F, I195M
Patient 1 Klon1	1 - 270	Y54H, N76D, H126Y, L132M, I233V , I266R, I269L /Insertion:126DQY	1 - 227	L49R, T68I, C76Y, Q101R, T127I /Insertion: 118DQY
Patient 1 Klon2	1 - 271	Y54H, H126Y, I233V , I266R, I269L /Insertion:126DQY	1 - 227	L49R, T68I, C76Y, Q101R, T127I /Insertion: 118DQY
Patient 1 Klon3	1 - 269	Y54H, F122S, H126Y, T128N, Y135S, V207A, I233V , I266R, I269L	1 - 227	T68I, S114P, P120T, T127P, W199R
Patient 1 Klon4	1 - 268	Y54H, H126Y, I233V , I266R /Insertion:126DQY	1 - 227	L49R, T68I, C76Y, Q101R, T127I /Insertion: 118DQY
Patient 1 Klon5	1 - 270	Y54H, H126Y, I233V , I266R, I269L /Insertion:126DQY	1 - 227	L49R, T68I, C76Y, Q101R, T127I, S155F Insertion: 118DQY
Patient 1 Klon6	1 - 270	Y54H, L115V, F122S, N123D, H126Y, S219A, I233V , I266R, I269L	1 - 227	F20S, S114P, T127I, S210R
Patient 2 Klon1	70 - 271	L91I, V173L , M204I , I233V	61 - 227	T127I, E164D, W196L

Patient 2 Klon2	70 - 266	L91I, V173L, M204I, I233V	61 - 227	T127I, E164D, W196L
Patient 2 Klon3	1 - 265	Y54H, V173L, M204I, I233V	1 - 227	T127I, E164D, W196L
Patient 2 Klon4	1 - 265	Y54H, N65S, V173L, M204I, I233V	1 - 227	T57A, T127I, E164D, W196L
Patient 2 Klon5	68 - 270	L80V, M204I, I233V	60 - 227	T127I, S136F, W196L, I218T
Patient 2 Klon6	68 - 265	L80V, L180M, M204I, I233V	60 - 227	T127I, S136F, W196L
Patient 3 Klon1	1 - 265	Y54H, I233V, N238T	1 - 227	T127I
Patient 3 Klon2	68 - 265	R153Q, I233V	60 - 227	T127I, G145R
Patient 3 Klon3	68 - 270	I233V, S246P	59 - 227	T127I, Y134F
Patient 3 Klon4	70 - 265	L80I, M204I, I233V	61 - 227	T127I, W196L
Patient 3 Klon5	70 - 265	I233V	61 - 227	T127I
Patient 3 Klon6	70 - 265	M129V, I233V, N238D	61 - 227	L95S, T127I

12. Danksagung

Herzlichen Dank an **HDoz Dr. Dieter Glebe** für das interessante Thema, die gute Betreuung, die Begutachtung dieser Arbeit und für sein generelles großes Engagement.

Herrn Prof. Dr. A. Bindereif danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie für die kompetente Betreuung und die Vertretung vor dem Fachbereich 08, Biologie und Chemie der Justus Liebig Universität Gießen.

Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich danke ich für die netten und lehrreichen Gespräche, sowie für die Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. R. H. Dammann danke ich für die freundliche Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Virologie der Justus Liebig Universität Gießen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank auch an meine **Eltern** für ihre Unterstützung während meiner Promotion und meines Lebens.

Ich danke außerdem **Katja** für ihre generelle Unterstützung in jeder Hinsicht und die Bereitschaft mich über einen nennenswerten Zeitraum zu ertragen.

13. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich an Eides Statt die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Andreas Geipel