

Angefertigt am
Fachbereich 08 - Biologie und Chemie
in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Virologie
am Fachbereich 11 - Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die antivirale Therapie der chronischen Hepatitis B:
Identifikation neuer Resistenzmutationen und
Optimierung der Verlaufskontrolle**

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

vorgelegt von
Pia Seiz
Master of Science

Gießen 2014

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Gutachter: Prof. Dr. Tina Trenczek
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das Hepatitis-B-Virus	5
1.1.1 Geschichtliche Einordnung.....	5
1.1.2 Taxonomie der <i>Hepadnaviridae</i>	5
1.1.3 HBV Genotypen und Subgenotypen.....	6
1.1.4 Morphologie des Hepatitis-B-Virus	7
1.1.5 Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus	8
1.1.6 Übersicht über den zellulären Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus	10
1.2 Klinische Aspekte der Hepatitis-B-Virus Infektion	12
1.2.1 Epidemiologie und Übertragung	12
1.2.2 Infektionsverlauf	13
1.2.3 Serologische Biomarker und Immunpathogenese bei einer HBV-Infektion	14
1.2.4 Impfprävention der Hepatitis B	15
1.2.5 Therapie einer chronischen Hepatitis-B-Virus Infektion	15
1.2.6 Entstehung und Selektion von Resistenzen	18
1.2.7 Möglichkeiten der Resistenzbestimmung	20
1.2.8 <i>In vivo</i> Infektionssysteme für die HBV-Infektion.....	20
1.3 Ziele der Arbeit.....	21
2. Material	23
2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	23
2.1.1 Kompetente Bakterien zur DNA-Transformation.....	23
2.1.2 Huh7	23
2.1.3 HepG2.....	23
2.1.4 HeLa	23
2.2 Plasmaproben des HBV-WHO-Genotypenpanel	24
2.3 Plasmide	24
2.3.1 pCEP-Puro.....	24

2.3.2	pCH-9-3091	25
2.4	PCR-Primer.....	26
2.5	Kits und Enzyme	28
2.6	Puffer und Medien.....	29
2.7	Antikörper, Antiseren und Nachweisproteine.....	31
2.8	Chemikalien, Puffer- und Medienzusätze	32
2.9	Geräte.....	33
2.10	Verbrauchsmaterialien	34
3.	Methoden	35
3.1	Extraktion von Virus-DNA aus humanem Serum.....	35
3.2	Klonierung.....	35
3.2.1	Klonierung des SHBs-Gens aus viraler DNA in pCEP-Puro	35
3.2.2	Klonierung verschiedener Domänen der HBV-Polymerase in pCH9-3091.....	37
3.3	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen:	37
3.4	Gerichtete Mutagenese zum Einfügen definierter Mutationen	38
3.4.1	Gerichtete Mutagenese mittels des In-Fusion HD - Klonierungskits	39
3.5	Transformation von Plasmid DNA in <i>E. coli</i>	40
3.6	Plasmidpräparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	40
3.7	Sequenzierung von Plasmiden.....	41
3.8	Kultivierung von Zelllinien.....	41
3.8.1	Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen.....	41
3.8.2	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen	42
3.9	Herstellung stabiler Zelllinien.....	42
3.10	Phänotypische Bestimmung der Resistenz von HBV-Varianten in der Zellkultur	43
3.10.1	Kultivierung von Hepatom-Zelllinien unter antiviralen Nukleos(t)id-Analoga	43
3.10.2	Reinigung der viralen DNA mit dem Pipettierautomaten Freedom EVO 100 ..	44
3.10.3	Quantifizierung der viralen DNA durch die Light Cycler Real Time PCR.....	45
3.10.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse	46
3.11	Quantitative Bestimmung des WHsAg mit der Laurell-Elektrophorese.....	47
3.11.1	Prinzip der Laurell-Elektrophorese	47

3.11.2	Durchführung der Laurell-Elektrophorese.....	47
3.12	Enzym-Immunoassay von HBsAg in Zellkulturüberständen.....	49
3.13	Quantitative Bestimmung der HBsAg Konzentration im diagnostischen Test.....	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Phänotypische Untersuchung von Therapie-resistenten HBV-Mutanten.....	51
4.1.1	Resistenzprofile des HBV Wildtyps und eines Therapie-resistenten Klon.....	51
4.1.2	Analyse des multiresistenten Klon 150-1 mittels Domänenaustausch im Gen der HBV-Polymerase.....	52
4.1.3	Analyse des multiresistenten Klon 150-1 mittels Aminosäurenaustausch.....	59
4.2	Untersuchung des Therapieverlaufs chronisch infizierter Woodchucks durch den Nachweis von WHsAg	69
4.2.1	Quantitative Bestimmung des WHsAg mit der Laurell-Elektrophorese	70
4.2.2	WHsAg-Konzentration im Blut chronisch infizierter Woodchucks nach Therapie mit neuartiger DNA-Impfung.....	70
4.2.3	WHsAg-Konzentration im Blut chronisch infizierter Woodchucks nach Impfung mit DNA-Vakzin und Gabe von PD-L1-Antikörpern.....	74
4.3	Untersuchung des SHBs verschiedener Genotypen anhand des WHO-Genotypen-Panels.....	76
4.3.1	Optimierung der SHBs Produktion.....	77
4.3.2	Reaktivität der verschiedenen Genotypen im eigenen EIA-System und im kommerziellen System (Architect, Abbott)	78
5.	Diskussion	81
5.1	Phänotypische Charakterisierung einer ungewöhnlichen HBV Variante aus einem chronischen HBV-Patienten (Klon 150-1).....	81
5.2	Untersuchung des Therapieverlaufs chronisch infizierter Woodchucks	87
5.2.1	Verlauf der WHsAg-Konzentration in chronisch infizierten Woodchucks nach der Behandlung mit DNA-Vakzinen	88
5.2.2	Verlauf der WHsAg-Konzentration in chronisch infizierten Woodchucks nach einer experimentellen Therapie mit einer DNA-Vakzine und anti-PD-L1-Antikörpern.....	89
5.3	Vergleich des SHBs verschiedener Genotypen des WHO-Genotypen-Panels	92
6.	Ausblick	96
7.	Zusammenfassung	97

8. Summary.....	98
9. Literaturverzeichnis	99
10. Abkürzungen	109
11. Anhang.....	112
12. Danksagung	114
13. Lebenslauf	115
14. Publikationen	116
15. Eidesstattliche Erklärung	117

1. Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

1.1.1 Geschichtliche Einordnung

Bereits im Altertum wurde die Gelbsucht mit einer Hepatitis, der Entzündung der Leber, in Verbindung gebracht. Diese kann durch verschiedene Erreger, wie Viren, Bakterien oder Parasiten ausgelöst werden. Im Laufe des 20. Jahrhunderts konnte der fäkal-oral übertragene Typ A von der durch Blut und Serum übertragenen Hepatitis B (Serumhepatitis) abgegrenzt werden. Lange Zeit war der Erreger der Serumhepatitis nicht bekannt. Ein erster Hinweis gelang 1963 dem Arzt und Anthropologen B. S. Blumberg. Er entdeckte im Blut von australischen Ureinwohnern 20 nm große Partikel [1]. Diese Partikel enthielten jedoch keine Nukleinsäuren und kamen daher als Erreger nicht in Frage. Blumberg konnte jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des sogenannten „*Australia antigen*“ und der Erkrankung mit der Serumhepatitis feststellen [2]. Im Jahre 1970 gelang es dann D. S. Dane unter dem Elektronenmikroskop 45 nm große Partikel nachzuweisen, die zunächst als „Dane-Partikel“ bezeichnet wurden [3]. Diese trugen auf ihrer Oberfläche das *Australia antigen*. Ein Jahr später konnte J. Almeida aus diesen Partikeln durch Behandlung mit Detergentien kleinere Partikel mit einem anderen Antigen, dem Core-Antigen, isolieren [4]. Mit dem Nachweis der endogenen DNA-Polymerase zunächst in *Australia antigen* positiven Seren [5] und dann auch innerhalb der Core-Partikel, [6] sowie der zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA mit einer Länge von ca. 3200 bp durch W.S. Robinson [7] wurde das „Dane-Partikel“ endgültig als Hepatitis-B-Virus (HBV) identifiziert. Deswegen wurde das *Australia antigen* als *Hepatitis B surface antigen* (HBsAg) und das Core-Antigen als *Hepatitis B core antigen* (HBcAg) bezeichnet. Ein detaillierterer Abriss der Entdeckungsgeschichte wurde kürzlich von W. Gerlich publiziert [8].

1.1.2 Taxonomie der *Hepadnaviridae*

Später wurden bei verschiedenen Tierarten strukturell und genetisch ähnliche Viren entdeckt. HBV und diese verwandten Virusarten werden in der Familie *Hepadnaviridae* zusammengefasst [9]. Diese Familie lässt sich in zwei Genera einteilen, die Avihepadnavirien und die Orthohepadnavirien. Alle Mitglieder der Familie weisen eine hohe Wirtsspezifität und einen starken Lebertropismus auf. Vertreter der Gattung der Avihepadnaviren infizieren verschiedene Vogelarten. Zu dieser Gattung gehören beispielsweise das *Duck-Hepatitis-B-Virus* (DHBV), das *Snow-Goose-Hepatitis-B-Virus* und das *Heron-Hepatitis-B-Virus* (HHBV).

Die Vertreter der Gattung der Orthohepadnaviren infizieren Säugetiere. Zu ihnen gehört das humane Hepatitis-B-Virus, das neben dem Menschen auch Altweltaffen, wie zum Beispiel Schimpansen und Gorillas infizieren kann. Daneben gibt es auch Vertreter, die Neuweltaffen befallen, wie beispielsweise das *Woolly-Monkey-Hepatitis-B-Virus* (WMHBV). Zudem wurden Orthohepadnaviren auch in Fledermäusen [10], [11] und einigen Nagetieren gefunden. Dazu gehören unter anderem das Woodchuck-Hepatitis-B-Virus (WHV) und das Ground-Squirrel-Hepatitis-B-Virus (GSHV).

1.1.3 HBV Genotypen und Subgenotypen

Das humane HBV lässt sich momentan in 9 verschiedene Genotypen (A-I) aufteilen. Die einzelnen Genotypen unterscheiden sich auf Sequenzebene um 7.5 – 15 %. Weiterhin werden die Genotypen in Subgenotypen unterteilt, die sich im Gesamtgenom um mindestens 4 % unterscheiden [12],[13],[14]. Die verschiedenen Typen weisen eine typische geographische Verteilung auf (Abbildung 1). So findet man im Nordeuropäischen Raum und in Deutschland gehäuft den Genotyp A2. Im Mittelmeerraum und dem mittleren Osten treten häufig die Subgenotypen D1-3 auf, während in Südostasien und Australien die Genotypen B und C zu finden sind. Den Genotypen F kann man hauptsächlich in Süd- und Mittelamerika sowie in Alaska nachweisen. Der Genotyp I wurde bisher in Südostasien gefunden [15].



Abbildung 1: Geographisch Verteilung der Genotypen und Subgenotypen des humanen Hepatitis-B-Virus (verändert nach [16]).

Für den diagnostischen Nachweis von HBsAg und HBV DNA in Patientenproben dient bisher der Genotyp A2 als Standard. Dieser Genotyp hat jedoch weltweit gesehen nur eine Verbreitung von etwa 1% [17],[18]. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der verschiedenen Genotypen in diagnostischen Tests war es daher nötig, internationale

Standards für den Nachweis der HBV-DNA zu etablieren. Daher wurde das WHO-Genotypen-Panel zusammengetragen, welches Wildtyp-Varianten der HBV-Genotypen A bis G umfasst. Damit soll der Nachweis der unterschiedlichen Genotypen optimiert und die Therapie verbessert werden.

1.1.4 Morphologie des Hepatitis-B-Virus

HBV ist umhüllt und hat im Elektronenmikroskop nach Negativ-Kontrastierung einen Durchmesser von 42 bis 45 nm [3] (Abbildung 2). Die Virionen sind mit einer Lipidmembran umhüllt, in welcher drei Arten von viralen Oberflächenproteinen verankert sind: das große (LHBs), das mittlere (MHBs) und das kleine (SHBs) Oberflächenprotein [4]. Die Oberflächenproteine werden in großem Überschuss von bis zu 1:10.000 gebildet und nicht zur Umhüllung des HBV verwendet sondern auch als subvirale Partikel der infizierten Zelle sezerniert [19]. Diese Teilchen bilden zusammen mit dem Virus das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg). Die subviralen Partikel bestehen aus Filamenten variabler Länge und Sphären mit einem Durchmesser von 20 nm. Sie enthalten keine Nukleinsäuren und sind daher nicht infektiös. Der Hauptbestandteil der Oberflächenproteine, sowohl bei den Virionen als auch bei den subviralen Partikeln, ist das SHBs. Insgesamt kommt das LHBs in Virionen und Filamenten häufiger vor als in Sphären. LHBs und SHBs sind für die Infektiosität und den Aufbau des HBV essentiell. Dem MHBs konnte bisher keine eindeutige Funktion zugewiesen werden [20]. Unter anderem ist es stärker glykosyliert als das LHBs oder das SHBs [21] und bindet Spezies-spezifisch eine modifizierte Form des Serumalbumins [22].

Die Oberflächenproteine weisen unterschiedliche Aminotermini, aber gleiche carboxyterminalen Enden auf, da sie einen gemeinsamen ORF nutzen. Das SHBs besteht lediglich aus der S-Domäne und hat eine Länge von 226 AS. Das MHBs ist zusätzlich zu der S-Domäne noch aminoterminal durch das PräS2 verlängert, welches eine Größe von 55 AS hat. Das LHBs bildet sich aus der S-Domäne, dem PräS2 und dem PräS1 (109 – 118 AS) [23]. Das LHBs kann zwei unterschiedliche Topologien aufweisen [24]. Sind die PräS1-Domänen nach innen gerichtet, interagieren diese mit den Core-Partikeln und führen zur Umhüllung und Sekretion des HBV [25]; nach außen gerichtet bindet die PräS1-Domäne an den spezifischen HBV-Rezeptor und ermöglicht so die Infektion [24],[20]. Das SHBs besitzt 4 transmembrane α -Helices und beinhaltet im Bereich der Aminosäuren 99 bis 161 die sogenannte „Antigene Schleife“, welche 8 Cysteine enthält, die intra- und intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Diese Schleife ist das Ziel vieler Antikörper, die im Blut nach einer HBV-Infektion gebildet werden [16],[26]. Im Inneren der Virionen befindet sich das Core (HBcAg), welches aus Core-Partikel-Dimeren aufgebaut ist, die über

Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [27]. Zusätzlich zu dem Core kann vom gleichen ORF ein 29 AS längeres, Nicht-Struktur-Protein abgelesen werden [28]. Dabei handelt es sich um das HBeAg, welches als sezernierte Form des Core-Proteins gesehen werden kann. Im Inneren des Cores befindet sich die partiell doppelsträngige DNA mit einer Länge von ca. 3200 Basen. Daran kovalent gebunden liegt ein Molekül der viralen Polymerase vor [29],[30]. Dieses Polyprotein besteht aus der Primer-Domäne, der Spacerdomäne, der Reversen Transkriptase-Domäne und der RNaseH-Domäne [31]. Daneben wurden auch zelluläre Hitze-Schock-Proteine und Proteinkinasen im Virion nachgewiesen, (Übersicht in: [26]).

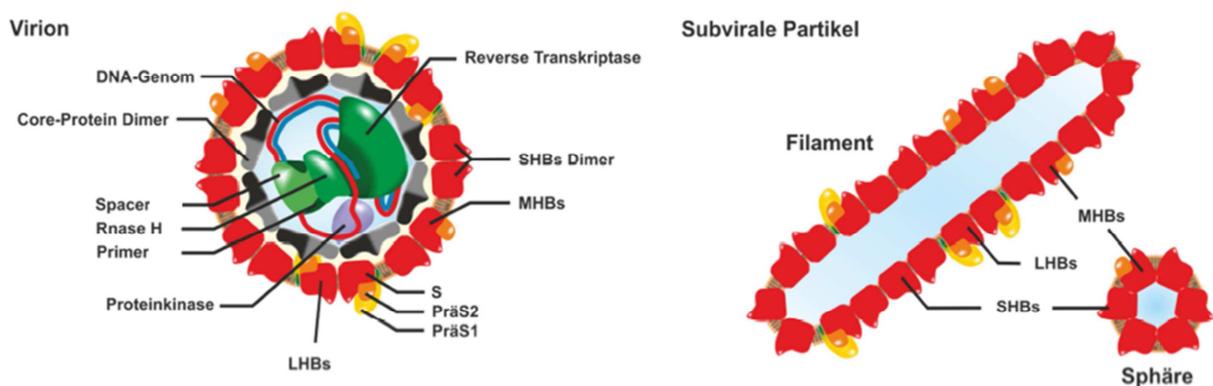


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Virionen und subviralen Partikeln. Core-Protein Dimere (grau) umhüllen die teilweise doppelsträngige DNA (rot-blau), die kovalent mit der Polymerase (grün) verbunden ist. Diese besteht aus der Primer-, der Spacer- und der RNaseH-Domäne sowie der Reversen Transkriptase. Die Proteinkinase ist in lila dargestellt. Das Core wird von den drei Oberflächenproteinen LHBs, MHBs und SHBs umhüllt, aus welchen auch die subviralen Partikel aufgebaut sind. Die S-Domäne (rot) ist in allen Oberflächenproteinen vorhanden. Zusätzlich dazu enthält das MHBs noch das PräS2 (orange). Das LHBs besteht aus der S-Domäne, der PräS2- und der PräS1-Domäne (gelb) (Verändert nach [26]).

1.1.5 Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus

Das HBV-Genom ist hochkonserviert und weist mit ca. 3200 Basen eines der kleinsten Virusgenome auf. Die exakte Größe des Genoms variiert etwas je nach Genotyp [32]. Es besteht aus einer partiell doppelsträngigen DNA mit einem unvollständigen Plusstrang, dessen Länge am 3'-Ende variiert, da die Sekretion der Viren noch vor Vollendung der DNA-Synthese stattfindet [33], [34] (Abbildung 3). Das 5'-Ende des Plusstrangs besteht jedoch immer aus einem 18 bp umfassenden RNA-Fragment, welches als Primer für seine Synthese gedient hat [35]. Der vollständige Minusstrang ist am 5'-Ende kovalent mit einer Tyrosin-Hydroxylgruppe in der Primer-Domäne der Polymerase verbunden [36],[37] und weist am 3'-Ende eine 10 bp lange Überlappung (terminale Redundanz) auf. Die Zirkularität des Genoms entsteht dadurch, dass das 5'-Ende des Plusstrangs mit den Enden des Minusstrangs überlappt [38]; in 10 bp-Bereich liegt sogar ein Dreifachstrang vor [39].

Der Minusstrang kodiert die 4 *open reading frames* (ORFs), die hoch konserviert sind und teilweise oder vollständig überlappen [40]. Davon werden 5 verschiedene virale RNAs abgelesen, die funktionell zellulären mRNAs gleichen und die aufgrund des gemeinsamen Polyadenylierungssignals das gleiche 3'-Ende haben [41]. Die für den viralen Replikationszyklus bedeutendste RNA ist die „prägenomische RNA“ (pgRNA), da sie als Matrize für die Replikation des Genoms dient. Gleichzeitig ist sie auch die Vorlage für die Synthese des Core-Proteins und der Polymerase. Die präC-mRNA kodiert für das HBeAg, wobei es sich um eine sekretierte Form des HBcAg handelt, die eine immunmodulatorische Funktion aufweist. Zusätzlich dazu liegen drei weitere subgenomische mRNAs vor, wovon eine für das LHBs kodiert. Eine weitere subgenomische mRNA ist die Matrize für das MHBs und das SHBs. Von der dritten subgenomischen mRNA wird das X-Protein abgelesen [41]. Dabei handelt es sich um ein Nicht-Struktur-Protein, das neben vielen postulierten Funktionen mit großer Wahrscheinlichkeit ein erster Transkriptionsaktivator für HBV in ruhenden Leberzellen ist [42].

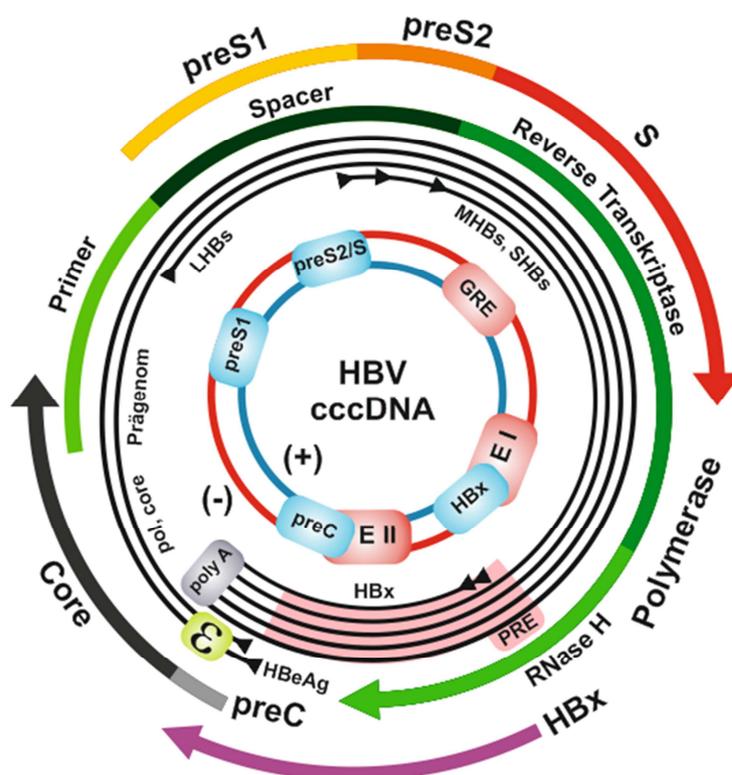


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBV-Genoms. Das HBV-Genom ist als doppelsträngige covalently closed circular DNA (cccDNA) (rot und blau) mit den Enhancern E I und E II, dem Glucocorticoid-Responsive-Element (GRE) (rote Boxen) und den verschiedenen Promotoren (blaue Boxen) dargestellt. Die posttranslationale regulatorische Element (PRE) ist in rosa abgebildet. Die zellulären mRNAs (schwarze Kreise) kodieren für 4 ORFs und haben einen gemeinsamen Poly-A-Schwanz (graue Box). Die prägenomische mRNA kodiert für die virale Polymerase (grün) und das Core-Protein (schwarz). Zudem enthält sie das Enkapsidierungssignal ε (hellgrüne Box). Eine weitere mRNA kodiert für das HBeAg. Drei subgenomische mRNAs kodieren für die Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs (gelb-orange-rot) sowie für das X-Protein (lila) (verändert nach [26]).

Für die Transkription werden vier Promotoren, zwei Enhancer [43], ein *Glucocorticoid-Responsive-Element* (GRE) [44] und ein negativ regulierendes Element (NRE) [45] genutzt. Zudem liegen auf dem Genom zwei Sequenzwiederholungen (*direct repeats*, DR1 und DR2) vor, die für die korrekte Replikation des Genoms nötig sind [46]. Außerdem findet sich auf der RNA das „Posttranslationale-Regulatorische-Element“ (PRE), welches einerseits das Splicen der nukleären HBV-RNAs verhindert und dennoch für deren wirksamen Transport aus dem Nukleus in das Zytoplasma sorgt [47]. Das Enkapsidierungssignal „Epsilon“ (ϵ) ist hochkonserviert [48] und sorgt bei dem richtigen Abstand vom 5'-Ende der mRNA für die Erkennung der prägenomischen RNA durch die HBV-Polymerase und die Enkapsidierung der Virionen [30], [49], [50].

1.1.6 Übersicht über den zellulären Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus

Die Bindung des HBV an Hepatozyten erfolgt zunächst über eine schwache Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane [51],[52]. Anschließend bindet das Virus hochspezifisch an den leberspezifischen Natrium-abhängigen Gallensäure-Rezeptor NTCP (*sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide*) [53] (Abbildung 4). Die genaue Aufnahme des Virus in die Zelle konnte noch nicht geklärt werden; vermutlich wird das Virus über endosomale Vesikel aufgenommen. In der Zelle wird die Virushülle entfernt und das Kapsid in das Zytosol entlassen. Durch Kerntransportsignale im C-Terminus des Core-Proteins wird das Kapsid zum Kern transportiert, wo es innerhalb der Kernporen desintegriert, wodurch das HBV-Genom in den Kern gelangt [54]. Dort wird die partiell doppelsträngige DNA durch zelluläre Enzyme in die kovalent geschlossene zirkuläre Form (cccDNA) umgewandelt [55] und mittels Histonen zu Nukleosomen verpackt, die dann als Minichromosom episomal im Zellkern vorliegen [56].

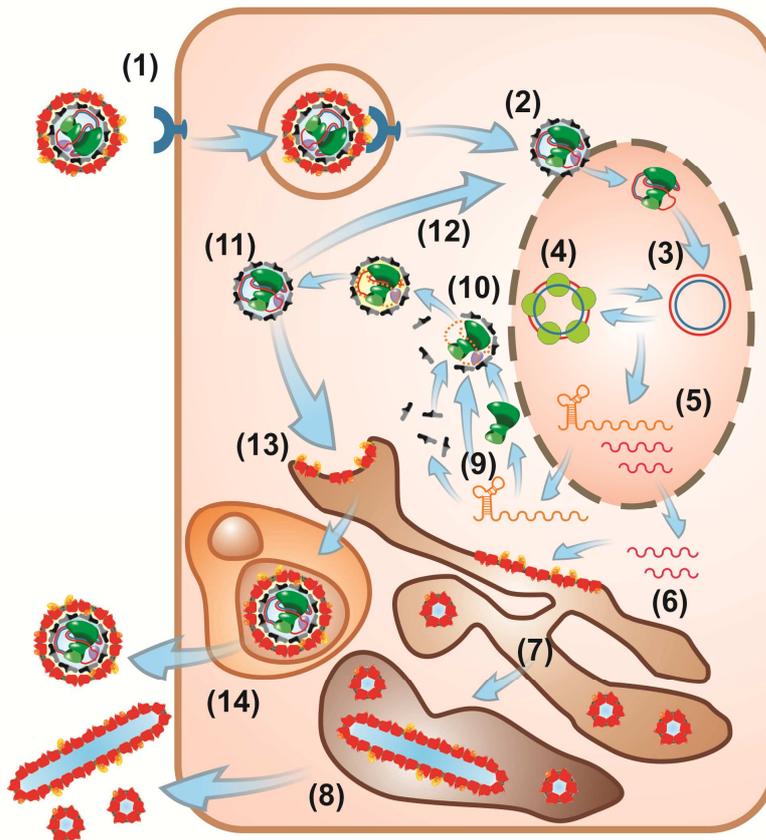


Abbildung 4: Übersicht über den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus. (1) Das Virus bindet an den NTCPR-Rezeptor auf der Zelle. (2) Das Nukleokapsid wird zum Kern transportiert. (3) Die partiell doppelsträngige HBV-DNA wird im Zellkern in cccDNA umgewandelt. (4) Epigenetische Modifikation der cccDNA durch zelluläre Mechanismen. (5) Bildung der subgenomischen und prägenomischen mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II. (6) Die mRNAs werden aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert. Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden die Oberflächenproteine translatiert. (7) Bildung der subviralen Partikel. (8) Ausschleusung der subviralen Partikel über den Golgi Apparat. (9) Translation der prägenomischen RNA in Core-Proteine und in die Polymerase. (10) Verpackung der Polymerase, der prägenomischen RNA und zelluläre Proteine durch die Core-Partikel. (11) Reverse Transkription und Zweitstrangsynthese Plusstrangsynthese für die Reifung des Kapsids. (12) Teilweise findet ein Rücktransport der Virionen in den Kern statt, um den Pool an cccDNA aufzufüllen. (13) Das gereifte Kapsid wird mit Oberflächenproteinen umhüllt. (14) Sekretion der Virionen über *multivesicular bodies* [26].

Die virale Replikation startet wahrscheinlich mit der Transkription der mRNA für das HBx Protein, welches die Transkription der prägenomischen und später der subgenomischen mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II stimuliert [57]. Die prägenomische RNA enthält das Enkapsidierungssignal ϵ , welches für deren Verpackung mit der viralen Polymerase in die Core-Partikel innerhalb des Zytosols sorgt [35], [58]. Im Inneren des unreifen Kapsids erfolgt dann die reverse Transkription und die Zweitstrangsynthese [59]. Durch die virale RNaseH wird währenddessen die prägenomische RNA abgebaut, sodass in dem Kapsid das Genom (mit Ausnahme des kurzen Plusstrangprimers) nur noch als DNA vorliegt. Anschließend kann ein Teil der reifen Kapside wieder zum Kern transportiert werden, was die HBV cccDNA-Menge im Kern auch ohne weitere Infektion der Zelle weiter

erhöhen kann [60]. Ein anderer Teil der Kapside wird an einer noch nicht genau charakterisierten intrazellulären Membran (ER oder *multivesicular bodies*) mit Oberflächenproteinen umhüllt. Diese Virionen werden anschließend über *multivesicular bodies* aus den Hepatozyten ausgeschleust [61]. Die subviralen Partikeln werden über den Golgi Apparat aus der Zelle geschleust [62], [63].

1.2 Klinische Aspekte der Hepatitis-B-Virus Infektion

1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Das Hepatitis-B-Virus kommt weltweit vor und führt zur fünft-häufigsten wesentlichen Virusinfektion beim Menschen [64]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass es derzeit etwa 240 Mio. chronische Träger gibt und jährlich ca. 600.000 Menschen an den Folgen der chronischen Virusinfektion sterben [65]. Zudem weist etwa ein Drittel der Weltbevölkerung serologische Merkmale einer HBV-Infektion auf und hatte somit eine vorübergehende Infektion durch das Virus [66]. In Westeuropa und Nordamerika liegt die Prävalenz der chronischen HBV-Infektion unter 1 % der Bevölkerung. Dagegen sind im nahen und mittleren Osten etwa 2 – 5 % der Einwohner chronisch infiziert. Die höchste Prävalenz findet man in Ostasien und in Subsahara-Afrika. Dort sind 5 – 10 % der Erwachsenen mit dem Virus infiziert. In Ostasien wird das Virus dabei hauptsächlich bei der Geburt übertragen, wohingegen in Afrika die Infektion meist in der Kindheit stattfindet. Die geringe Trägerrate in Deutschland kann man vorwiegend auf die besseren hygienischen Bedingungen zurückführen [67].

Die Übertragung des HBV erfolgt hauptsächlich parenteral über Blut. Bei hochvirämischen Trägern kann die Verbreitung jedoch auch über andere Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Speichel oder andere Sekrete erfolgen. Da das Virus sehr infektiös ist, reichen schon Mengen von etwa 1 nl Blut eines hochvirämischen Trägers mit etwa 10^9 bis 10^{10} Viren pro ml, um eine Infektion zu verursachen [68]. Die perinatale Übertragung findet man hauptsächlich in hochendemischen Gebieten. Zudem kommt es dort auch häufig zu einer Verbreitung im Kleinkindalter. In Ländern mit einer geringeren Durchseuchungsrate erfolgt die Übertragung hauptsächlich durch sexuelle Kontakte. Zunehmend effizientere Testsysteme vermindern das Risiko einer Infektion durch gespendetes, kontaminiertes Blut auf ein vernachlässigbares Niveau [69].

1.2.2 Infektionsverlauf

Der Verlauf einer HBV-Infektion kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. So spielen zum Beispiel der Immunstatus, das Alter und die Infektionsdosis eine wichtige Rolle. Bei Jugendlichen und Erwachsenen mit einem intakten Immunsystem und einer geringen Virusdosis verläuft die Infektion in 65 % der Fälle subklinisch. Dies führt dann zur Immunisierung der Patienten, welche man im Blut über Antikörper gegen das Core-Antigen (anti-HBc) und das HBsAg (anti-HBs) nachweisen kann. Erfolgt die Infektion mit einer hohen Virusdosis, bildet sich nach einer Inkubationszeit von 45 – 180 Tagen meistens eine akute Hepatitis aus. Dabei treten zunächst grippeähnliche Symptome, wie zum Beispiel Fieber, Glieder- und Kopfschmerzen, Müdigkeit und Unwohlsein auf. Im weiteren Verlauf kommt es zu Schmerzen im Oberbauch und Ikterus (Gelbsucht). Serologisch lässt sich eine Erhöhung der Alanin-Aminotransaminase (ALT) feststellen sowie HBsAg, anti-HBc IgM und HBV DNA nachweisen. Meistens liegt auch HBeAg vor. Bei 90 – 95 % einer akuten Infektion kommt es zur Ausheilung der Hepatitis. Dies kann man durch den Nachweis der anti-HBs- Antikörper im Blut des Patienten zeigen. Bei etwa 1 % der akuten Fälle kann sich eine fulminante Hepatitis ausbilden. Bei dieser Verlaufsform kommt es zur massiven Schädigung des Lebergewebes und unbehandelt in 70 % der Fälle zum Tod des Patienten [70]. Bei etwa 5 – 10 % der akuten Fälle kommt es zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis. Bei Neugeborenen tritt die Form der chronischen Infektion jedoch in 90 % der Fälle auf [71]. Eine Hepatitis-B-Infektion ist dann chronisch, wenn nach 6 Monaten immer noch HBsAg im Blut des Patienten zu finden ist. Sie verläuft zumeist jahrzehntelang ohne Symptome, führt jedoch unbehandelt bei etwa 20 % der Patienten zur Bildung von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Serologisch kann es im Verlauf einer chronischen Hepatitis zu einer Serokonversion von HBeAg-positiv zu HBeAg-negativ kommen. Es konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Abnahme der Virusreplikation und oft zu einem milderem Krankheitsverlauf führt [72].

Die Replikation des HBV selbst ist nicht zytotoxisch. Die Zerstörung der Hepatozyten während der Infektion ist auf die Antwort des Immunsystems und speziell der zytotoxischen T-Zellen zurückzuführen, wodurch HBV-infizierte Zellen zerstört werden [73]. Wird bei einem Patienten eine Serokonversion von HBsAg zu anti-HBs beobachtet, geht man normalerweise von einer Heilung aus. Doch selbst in diesem Fall kann immer noch eine versteckte (also „okkulte“) HBV-Infektion vorliegen, die sogenannte „okkulte Hepatitis-B“. Dabei ist das Virus selbst mit den heutigen Nachweismethoden nur schwer oder gar nicht detektierbar. Hier wird die Virusreplikation durch ein aktives Immunsystem sehr effizient kontrolliert [74]. Bedeutsam wird die okkulte Hepatitis B, wenn das Immunsystem in der Folgezeit stark geschwächt wird. Bei einer aktiven Suppression des Immunsystems, zum Beispiel durch eine Chemotherapie kann es dann zu einer Reaktivierung der Infektion kommen, die, nach Absetzen der

Immunsuppression und Wiedereinsetzen des Immunsystems, zur fulminanten Hepatitis B mit finalem Leberversagen führen kann [75].

1.2.3 Serologische Biomarker und Immunpathogenese bei einer HBV-Infektion

Während des Verlaufs einer HBV-Infektion kann man verschiedene serologische Biomarker im Blut des Patienten nachweisen. Das HBsAg stellt dabei einen der ersten nachweisbaren Indikatoren einer HBV-Infektion dar. Zudem wird die chronische Form der Hepatitis B dadurch definiert, dass das HBsAg länger als 6 Monate im Blut persistiert. Gegen dieses Antigen werden schützende anti-HBs-Antikörper gebildet. Diese Antikörper bilden sich bei einer akuten Infektion etwa 4 Monate nach dem Ausbruch der Krankheit und zeigen die Genesung des Patienten an. Sie werden von B-Zellen gebildet und führen zur Immunität gegen HBV. Anti-HBs-Antikörper werden daher auch für die passive Immunisierung gegen HBV eingesetzt. Bei chronisch infizierten Patienten kommt es nur in etwa 1-2 % der Fälle zu einer Serokonversion [71]. Das HBsAg dient jedoch als wichtiger Marker für den Verlauf einer chronischen Infektion. Kurze Zeit nach dem Nachweis des HBsAg im Blut kann man auch anti-HBc Antikörper gegen das Core-Protein (HBcAg) nachweisen. Diese können das Virus zwar nicht neutralisieren, lassen aber Rückschlüsse über den Verlauf der Infektion zu. Liegt anti-HBc als IgM-Antikörper vor, kann man mithilfe weiterer virologischer Marker darauf schließen, dass es sich um eine akute Infektion handelt. Bei einer chronischen oder ausgeheilten Infektion liegen dagegen meist IgG-Antikörper gegen das HBcAg vor. Diese können auch noch Jahre nach einer überstandenen Infektion im Blut nachweisbar sein. Das HBeAg kann man bei einer akuten Infektion etwa zur gleichen Zeit wie das HBsAg nachweisen. Es wird ins Blut sekretiert und hat eine immunmodulatorische Wirkung. Gegen dieses Antigen werden anti-HBe-Antikörper gebildet, was zu einer Serokonversion führt. Dies kann bei chronischen Patienten mehrere Jahre bis Jahrzehnte dauern, oder nie vorkommen. Ein weiterer wichtiger Nachweis erfolgt über die HBV-DNA zur Bestimmung des Virus-Titers. Zur Vermeidung von hepatozellulärem Karzinom oder Leberzirrhose sollte dieser so gering wie möglich sein und gegebenenfalls durch eine spezifische antivirale Therapie gesenkt werden (zusammengefasst aus [16]). Insgesamt wird der Verlauf der HBV-Infektion entscheidend von der Antwort des Immunsystems des Patienten beeinflusst. Bei einer akuten Infektion sind hauptsächlich CD8+ T-Zellen beteiligt, während sie bei der chronischen Hepatitis-B-Infektion eine eher untergeordnete Rolle spielen [73]. Die T-Zellen können dabei auf zwei unterschiedliche Arten gegen HBV-infizierte Hepatozyten reagieren. Die zytotoxischen T-Zellen können infizierte Zellen direkt angreifen, oder sie sorgen für die Sekretion antiviraler Zytokine, wie zum Beispiel Interferon γ (IFN γ) und somit indirekt für die

Elimination des Virus [76]. Während einer akuten Infektion sekretieren in der Anfangsphase vermutlich T-Zellen Zytokine, die die Virusreplikation hemmen [77]. Zytotoxische T-Zellen bewirken dann in der Endphase die endgültige Viruselimination [77], [78].

1.2.4 Impfprävention der Hepatitis B

Zum Schutz gegen die HBV Infektion gibt es seit den 1980er Jahren eine Impfung, die aus historischen Gründen nur aus dem kleinen Oberflächenprotein (SHBs) des HBV-Genotyps A2 besteht und in rekombinanten Hefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) hergestellt wird [79]. Die Impfung schlägt bei jungen, gesunden Personen sehr gut an, manche Personengruppen (Immunkompromittierte, Raucher, Ältere) bilden jedoch nach der Impfung keine oder nur eine geringe Antikörperantwort aus. Dabei handelt es sich um die sogenannten *Non-* bzw. *Low-Responder*, die keinen ausreichenden Schutz gegen eine Infektion mit HBV besitzen. Dennoch kann es trotz erfolgreicher Impfung und ausreichender Antikörpermenge im Blut zu HBV-Infektionen kommen. Diese Virus-Varianten enthalten („Immun-Escape“-)Mutationen, die innerhalb der Antigenen Schleife des SHBs lokalisiert sind. Dadurch können dann die vormals neutralisierenden (Impf)-Antikörper nicht mehr an diese Virus-Varianten binden [80], [81], [82]. Ein Beispiel einer typischen Impf-induzierten HBV-Immun-Escape Mutation wurde erstmals während einer Studie in Italien in den 1990er Jahren untersucht. Hier wurden Kinder HBV-positiver Mütter direkt nach der Geburt gegen HBV geimpft und zeigten trotz primärer anti-HBs-Immunantwort später eine HBV-Infektion. Nach der Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass dabei eine HBV-Variante mit der Mutation sG145R in der S-Domäne des HBV vorlag [83], [84].

1.2.5 Therapie einer chronischen Hepatitis-B-Virus Infektion

Bei immunkompetenten, gesunden Patienten muss eine akute HBV-Infektion mit einem HBV-Wildtyp in der Regel nicht behandelt werden, da sie in über 90 % der Fälle von alleine ausheilt und dann zur Immunität führt. Bei einer chronischen Infektion ist es dagegen notwendig, die Viruslast im Blut des Patienten zu senken, da sonst das Risiko einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms erheblich ansteigt. Dieses Risiko erhöht sich direkt mit der Viruslast des Patienten [85], [86], [87], [88]. Therapeutisches Ziel bei einer chronischen HBV Infektion ist es zudem den Spiegel der Alanin-Aminotransferase (ALT) zu senken und das Immunsystem so zu stimulieren, dass es im Idealfall zu einer HBeAg-, besser noch zu einer HBsAg- Serokonversion kommt [66]. Derzeit gibt es zur generellen Behandlung einer HBV-Infektion nur zwei Möglichkeiten. Die Gabe von Interferon α dient zur unspezifischen Stimulation des Immunsystems um die Infektion zu kontrollieren.

Diese Behandlung führt vor allem bei HBeAg-positiven Patienten mit geringer Viruslast und hohen ALT-Werten zum Erfolg. Insgesamt ist die Therapie mit Interferon bei etwa 40 % der dafür geeigneten Patienten erfolgreich und führt dort zu einer HBeAg-Serokonversion und einer verringerten Viruslast [89], [90]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der Therapie mit Interferon α stark vom HBV-Genotyp abhängig ist, mit welchem der Patient infiziert ist. Die Therapie ist bei den Genotypen A und B erfolgreicher, als bei den Genotypen C und D [91]. Die Interferonbehandlung erfolgte früher mit dessen natürlicher Form, neuerdings modifiziert als pegyliertes Interferon α , was weniger Injektionen erfordert und einen gleichmäßigeren Wirkspiegel ermöglicht. Die Behandlungsdauer wurde im Lauf von drei Jahrzehnten von 4 - 6 Monaten auf bis zu 48 Wochen erhöht. Die Behandlung mit Interferon α führt jedoch häufig zu starken Nebenwirkungen, wie grippeähnlichen Symptomen, Depression, Leukopenie oder Haarausfall [89].

Ist eine Behandlung mit Interferon nicht möglich oder nicht erfolgreich, erfolgt eine Therapie mit spezifischen Inhibitoren der HBV Reversen Transkriptase mittels Nukleos(t)idanaloga (NA). Diese werden als Vorstufe oral eingenommen und erst in den Hepatozyten durch zelluläre Kinasen in ihre aktive Form umgewandelt. Dann konkurrieren sie dort mit den natürlichen Nukleotidtriphosphaten. Werden die NA in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut, kommt es dann zum Kettenabbruch, wodurch die Replikation des Virus gestoppt wird [92]. Im Vergleich zu der Behandlung mit Interferon α führt die Behandlung mit NA zu geringeren Nebenwirkungen. Zudem werden die zellulären DNA-Polymerasen nicht beeinflusst. Eine vollständige Heilung ist mit der alleinigen Gabe von NA jedoch nur schwer möglich, da die schon vorhandene cccDNA in der Zelle nicht eliminiert wird. Daher muss die Behandlung in der Regel lebenslang fortgesetzt werden [93]. Zudem konnte gezeigt werden, dass es bei einer Therapie mit NA zu einem langsameren Abfall der HBsAg-Konzentration im Blut kommt, als bei der Gabe von Interferon [9]. Derzeit haben 5 NA eine klinische Relevanz in der Behandlung der chronischen HBV Infektion, Adefovir, Entecavir, Lamivudin, Tenofovir (Abbildung 5) und Telbivudin. Bei dem Inhibitor Lamivudin handelt es sich um einen zunächst nur in der HIV-Therapie zugelassenen Inhibitor, der im Jahre 1999 auch für die Therapie gegen HBV zugelassen wurde [94]. Das Medikament ist ein Analogon zu dem Nukleosid Cytidin. Bei der Mehrzahl der Patienten kommt es jedoch bei Monotherapie zu einer starken Resistenzbildung [93]. Entecavir ist ein Nukleosidanalogen zu Guanosin und wurde zunächst als Medikament gegen Herpes entwickelt. Seit 2006 ist es für die Monotherapie von HBV zugelassen und zeichnet sich durch eine starke antivirale Wirkung bei geringer Resistenzbildung aus.

Bei den Inhibitoren Adefovir und Tenofovir handelt es sich um Medikamente, die ebenfalls zunächst nur in der HIV-Therapie zugelassen waren. Beide sind azyklische Phosphonate

und sind Nucleotidanaloga zu Adenosin. In der klinischen Anwendung erwies sich Adefovir jedoch als stark nephrotoxisch, sodass es nur in verminderten Dosen eingesetzt werden konnte, was eine geringere Wirksamkeit und eine Anfälligkeit für Resistenzentwicklung bewirkt. Tenofovir weist gegenüber Adefovir eine weitere Methylgruppe auf und kann in etwa 30-fach höherer Konzentration bei chronischen HBV-Patienten eingesetzt werden [95]. Damit sind bisher keine direkten Resistenzen gegenüber Tenofovir zu beobachten [96]. Daher wird Tenofovir neben Entecavir derzeit am erfolgreichsten bei der Behandlung der chronischen Hepatitis B eingesetzt.

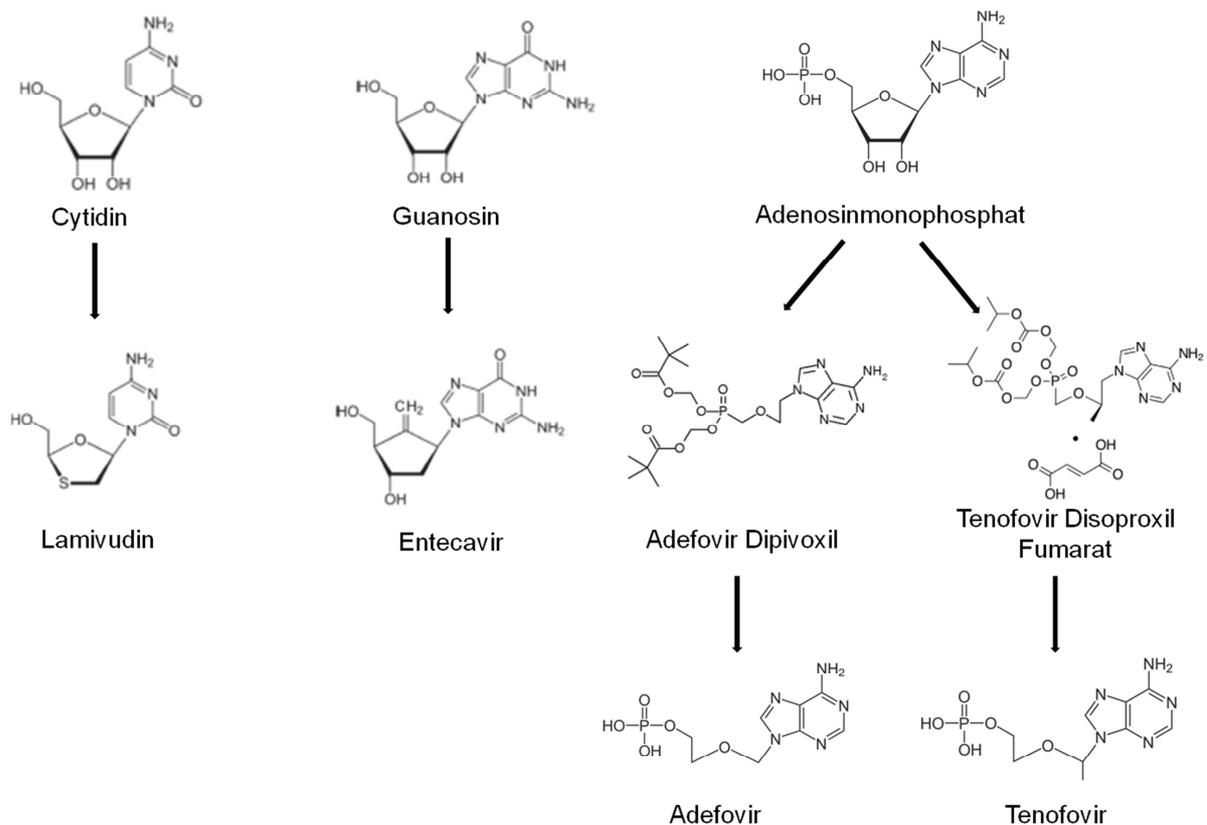


Abbildung 5: Nucleos(t)idanaloga zur Therapie der chronischen Hepatitis B. Abgebildet sind die Strukturformeln der verschiedenen Medikamente mit ihren natürlichen Analoga. Adefovir und Tenofovir werden dem Patienten als Vorstufen verabreicht (Adefovir Dipivoxil und Tenofovir Disoproxil Fumarat), die dann in der Zelle zur aktiven Form umgewandelt werden.

Weitere Angriffspunkte liegen in der Inhibition der Virusbindung an die Zellen durch präS1 - Lipopeptide [97]. Zusätzlich zu der Möglichkeit das Virus direkt anzugreifen, werden derzeit in Studien verschiedene Therapien untersucht, das Immunsystem zu steigern [98].

1.2.6 Entstehung und Selektion von Resistenzen

HBV unterliegt einer hohen Mutationsrate, wodurch sich leicht resistente Virusvarianten entwickeln können. Jedoch erscheint das HBV-Genom der jeweils dominanten viralen Variante während der Übertragung eines HBV-Wildtyps bei gesunden Personen außerordentlich stabil [99]. Unter starkem selektivem Druck jedoch, wie z.B. während einer antiviralen Therapie, können sehr schnell antivirale Resistenz-Varianten ausselektiert werden. Mehrere Faktoren beeinflussen dabei eine schnelle Anpassung des Virus. Bei Patienten mit chronisch-aktiver Hepatitis B und hoher Viruslast (10^9 bis 10^{10} Viren/ml), können täglich bis zu 10^{13} neue Viren pro Tag gebildet werden [100]. Zusätzlich zu der starken Replikation des Virus besitzt weder die humane zelluläre DNA-abhängige RNA Polymerase II, noch die virale Polymerase eine „*proofreading*“-Funktion. Dadurch kommt es zu mindestens einem Fehler pro 100.000 Basen [101],[102]. Dies bedeutet, dass theoretisch aufgrund des kleinen Genoms von 3,2 kb jede Base des Genoms täglich etwa 1000-mal mutiert werden kann. Damit liegt neben dem Wildtyp immer auch eine Vielzahl an Mutanten vor, die in der Summe als Quasispezies bezeichnet werden. Dieser Pool an Quasispezies persistiert dann auch immer in Form der cccDNA in den Hepatozyten, die eine lange Halbwertszeit aufweisen, was zu einem „viralen Gedächtnis“ führt [103], [104]. Daher ist es wichtig die Viruslast in einem Patienten möglichst schnell und dauerhaft zu senken, wodurch die Resistenzentwicklung verlangsamt werden kann [96]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Resistenzbildung ist die Überlappung der ORFs von HBV. Dadurch beeinflusst eine Punktmutation oft gleichzeitig mehrere virale Proteine. Dies spielt vor allem eine Rolle bei dem Polymerase-ORF, welche unter anderem für die Reverse Transkriptase (RT) kodiert. Dieser ORF wird von S-ORF überlagert, welcher für die Antigene Schleife kodiert, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung des Virus durch das Immunsystem spielt.

Klinisch relevante Therapie Resistenz-Mutationen liegen auf dem Gen der viralen Polymerase in der RT-Domäne und führen zu einer Resistenz gegen bestimmte Medikamente [105]. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Viruslast und des ALT-Spiegels. Eine Resistenz ist dadurch definiert, dass trotz andauernder Therapie die Viruslast um den Faktor 10 oder mehr ansteigt. Meist ist für die Resistenzentwicklung eine einzige Mutation im viralen Genom ausreichend. Bei einem Selektionsdruck, durch zum Beispiel einen RT-Inhibitor, setzt sich dann die bereits vorhandene Virusvariante aus der viralen Quasispezies mit der jeweils höchsten Resistenz und Replikationsfähigkeit durch. Da diese Resistenz-vermittelnden Mutationen häufig eine Verringerung der viralen Fitness zur Folge haben, kommt es danach oft zur Selektion von Sekundärmutationen, die die Fitness wieder erhöhen [105]. Die Resistenzbildung ist abhängig von dem eingesetzten Inhibitor (Abbildung 6). Bei Lamivudin zeigt sich die stärkste Resistenzentwicklung. Nach einem Jahr kann man bereits in 23 % der Patienten entsprechende Resistenzmutationen finden. Nach fünf Jahren

ist dies bei 80 % der Patienten der Fall [93]. Dabei handelt es sich primär um die Mutation an der Aminosäure-Position 204 im katalytischen Zentrum (YMDD) der Reversen Transkriptase. Dabei findet man die Mutation rtM204I häufig alleine, wohingegen die Mutation rtM204V meistens mit der kompensatorischen Sekundärmutation rtL180M auftritt [106], [107]. Eine weitere Resistenzmutation gegen Lamivudin ist die Mutation rtA181T/V, die klinisch jedoch weniger bedeutsam ist und für eine schwächere Resistenz sorgt. Bei dem NA Entecavir bilden sich nach 5 Jahren bei nur 1,2 % der Patienten Resistenzen gegen diesen Inhibitor aus. Wurden diese jedoch zuvor mit Lamivudin behandelt, lag die Resistenzbildung nach 5 Jahren bei 51 %, da zu den beiden Lamivudin-Resistenzen rtL180M und rtM204V/I nur noch eine weitere Mutation für eine Entecavir-Resistenz benötigt wird [93]. Bei dem NA Adefovir kommt es nach 5 Jahren bei 29 % der Patienten zu einer antiviralen Resistenz. Die Mutationen, die hierbei die stärkste Resistenz gegen Adefovir auslösen sind rtA181T/V und rtN236T [108, 109]. Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Adefovir und Tenofovir verursachen diese Mutationen auch eine verringerte Wirksamkeit von Tenofovir [110], [111]. Dennoch ist für Tenofovir im Gegensatz zu allen anderen NA auch nach 5-jähriger Anwendung keine klinische Resistenzentwicklung beschrieben worden [112].

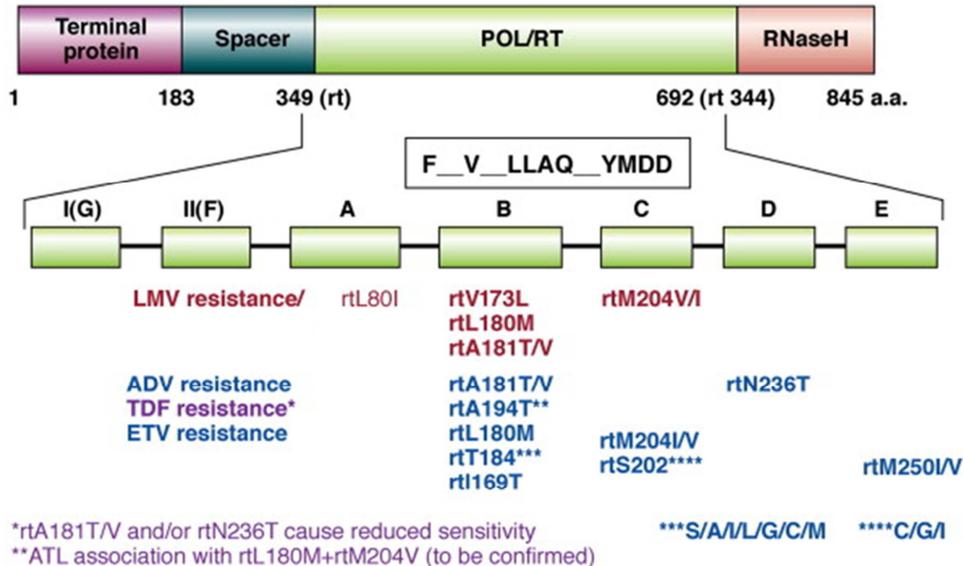


Abbildung 6: Darstellung der bedeutendsten Resistenzmutationen des RT-Bereichs von HBV. Im oberen Bereich sieht man die Polymerase mit den einzelnen Domänen, wovon die RT-Domäne nach unten hin vergrößert dargestellt ist. Darin abgebildet sind die katalytischen Subdomänen (A-F) sowie die Inhibitoren mit deren jeweiligen bekannten Resistenzmutationen [93].

1.2.7 Möglichkeiten der Resistenzbestimmung

Für eine optimale Behandlung einer HBV-Infektion ist es wichtig die im Patienten vorkommenden Resistenzmuster zu kennen, um die Therapie möglichst gut anpassen zu können. HBV-Resistenzen können genotypisch und phänotypisch detektiert werden [113]. Für einen genotypischen Nachweis der Resistenzen wird zunächst die virale DNA isoliert und über eine PCR amplifiziert. Eventuell vorkommende, bereits bekannte Resistenzmutationen können nach Sequenzierung des viralen Genoms und Vergleich mit Datenbanken (z.B. GenBank) bestimmt werden [114], [115]. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich, neue Resistenzmutationen zu detektieren sowie den Resistenzfaktor und die virale Fitness einer spezifischen HBV-Mutante zu ermitteln [116]. Zur phänotypischen Analyse werden replikationsfähige HBV-Plasmide in kultivierbare humane Hepatomzelllinien (Huh7 oder HepG2) transfiziert. Dann kann die Replikation abhängig von spezifischen Inhibitoren bestimmt werden. Durch den Vergleich mit einem HBV-Wildtyp kann dann der Grad der Resistenz in Form der Inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und des Resistenzfaktors (RF) ermittelt werden [113]. Insgesamt existieren für die Untersuchung der HBV-Mutanten verschiedene phänotypische Assays [113], [117]. Dabei gibt es Transfektionssysteme, bei welchen das zirkularisierte Genom ohne Vektor eingesetzt wird [118], aber auch Systeme, bei welchen das HBV-Genom als Überlängenkonstrukt in einen Expressionsvektor inkloniert wurde [113]. Um die HBV-DNA in die Zelle zu bringen, wurden auch virale Vektoren eingesetzt, wie Baculoviren [119] oder Adenoviren [120]. In den meisten Fällen wird das HBV-Genom, welches aus Patienten isoliert wurde, in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend in Hepatomzelllinien transfiziert [121], [122], [123]. Die Quantifizierung erfolgte früher meistens mittels Southern Blot [124], wird heute jedoch hauptsächlich mittels quantitativer Real Time PCR durchgeführt [113].

1.2.8 *In vivo* Infektionssysteme für die HBV-Infektion

Wegen der hohen Wirtsspezifität des humanen HBV können die klassischen Tiermodelle, wie Maus, Meerschweinchen oder Ratte nicht als *in vivo* Infektionssysteme für die Untersuchung von HBV genutzt werden. Aufgrund des gleichen Verlaufs der HBV-Infektion und der Infizierbarkeit mit dem humanen HBV stellen Schimpansen das beste Tiermodell dar [125]. Es ist jedoch aus wirtschaftlichen und ethischen Gründen ungeeignet und wird kaum noch genutzt. Ein weiteres Tiermodell ist das ostasiatische Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) [126], [127]. Dessen Hepatozyten sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* suszeptibel für HBV [128]. Der Infektionsverlauf *in vitro* ist dabei ähnlich zu dem in Menschen [129]. Zusätzlich dazu dienen das Woodchuck-Hepatitis Virus (WHV) des Amerikanischen Waldmurmeltiers

und, wenn auch immer seltener, das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) der Peking-Ente als Surrogat-Modelle in der HBV-Forschung.

1.3 Ziele der Arbeit

Wie bereits früher von der Autorin und A. Geipel beschrieben, zeigt der von einem chronisch infizierten und Tenofovir-therapierten Patienten stammende HBV-Klon 150-1 eine außergewöhnlich hohe Resistenzen gegen die Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir, die auf Mutationen außerhalb der RT-Domäne zurückzuführen sind [130], [131]. In dieser Arbeit sollte der Klon 150-1 weiter analysiert werden. Dabei sollte die verantwortliche Resistenzmutation zunächst auf einen Bereich der Polymerase eingegrenzt werden. Anschließend sollte die für die hohe Resistenz verantwortliche Einzelmutation ermittelt werden. Dazu sollten durch Klonierung und gerichteter Mutagenese verschiedene Klone hergestellt werden, um diese dann phänotypisch zu untersuchen und mit dem Klon 150-1 zu vergleichen.

In zwei weiteren Untersuchungen sollten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Roggendorf, Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen, Therapieerfolge bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks untersucht werden. In einer der Studien wurden die Tiere dazu mit Entecavir und einer „prime-boost“ DNA Vakzinierung zur Stimulation von T-Zellen gegen T-Zell-Epitope des WHsAg und WHcAg therapiert. In einer weiteren Studie der Essener Gruppe wurden zusätzlich zu dieser Behandlung noch spezifische Antikörper gegen den *programmed death ligand 1* (PD-L1) verabreicht. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die Dysfunktion („Erschöpfung“) der T-Zellen während der chronischen Hepadnavirus-Infektion des Menschen [132] und des Woodchucks [133] unter anderem auch durch die Wirkung des PD1/PD-L1 Systems erzeugt wird. Zunächst bewirkt die Interaktion von PD1- Rezeptor und Ligand eine „Erschöpfung“ der T-Zellen und schließlich auch deren Apoptose. Das Ausmaß des hepadnaviralen Befalls der Leber bei Mensch [64] und Woodchuck [134] kann recht gut anhand der Serumkonzentration der sezernierten subviralen *surface antigen* Partikel (HBsAg bzw. WHsAg) bestimmt werden. Daher war einer der zentralen Erfolgsparameter die Menge des WHsAg im Therapieverlauf. Quantitative Tests für HBsAg sind am Markt verfügbar, Tests für WHsAg nicht. Schon vor vielen Jahren war jedoch die quantitative Bestimmung des WHsAg durch die Laurell-Elektrophorese am Institut für Medizinische Virologie in Gießen etabliert worden [135],[136]. Daher wurde die Gießener Arbeitsgruppe um D. Glebe schon mehrfach gebeten, WHsAg während der Therapieveruche der Essener Gruppe quantitativ zu bestimmen [137].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung stabiler, eukaryoter Zelllinien zur SHBs-Produktion aus verschiedenen HBV-Genotypen des WHO-Genotypen-Panels. Die Erfahrung der WHO bzw. der beauftragten Institute (National Institute of Biological Standardization and Control des UK, NIBSC, und Paul-Ehrlich-Institut) zeigt, dass die aus menschlichen Blutplasmen erstellten Internationalen Standardpräparate nach kurzer Zeit verbraucht sind und exakt vergleichbarer Ersatz nicht geschaffen werden kann. Dazu sollten *in vitro* rekombinantes SHBs mit der SHBs-Sequenz der jeweiligen Panelproben exprimiert werden und Unterschiede in verschiedenen Nachweissystemen untersucht werden. Die Proben sollten in einem laboreigenen EIA mit dem SHBs-spezifischen monoklonalen Antikörper C20/02 und in einem kommerziellen diagnostischen Test, wie z.B. dem qHBsAg-Test im System „Architect“ (Fa. Abbott) analysiert werden.

2. Material

2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Alle Zelllinien und Bakterienstämme wurden vom Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Kompetente Bakterien zur DNA-Transformation

Die für die Transformation von Plasmiden eingesetzten chemisch behandelten kompetenten Bakterien sind Bestandteil des In-Fusion HD cloning Kits (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, 639648, Stellar Chemically Competent Cells; Katalog-Nr.: 639648). Es handelt sich um ein Derivat des Bakteriums *Escherichia coli*.

2.1.2 Huh7

Huh7-Zellen sind eine humane Hepatomzelllinie, die 1982 aus einem hepatozellulären Karzinom eines Japaners isoliert wurde [138]. Für die phänotypische Untersuchung resistenter Mutanten (siehe 3.10) wurde ein Klon der Huh7 Linie vom Institut für Virologie der Technischen Universität München überlassen, bei welchem kein Re-Import der HBV-DNA-haltigen Core-Partikel in den Kern stattfinden soll (persönliche Mitteilung U. Protzer, München).

2.1.3 HepG2

HepG2-Zellen wurden aus dem Material einer Biopsie eines Hepatoblastoms gewonnen, die an einem 15-jährigen Amerikaner durchgeführt wurde. Diese Zellen weisen einige leberzellspezifische Differenzierungen auf [139].

2.1.4 HeLa

HeLa Zellen wurden aus einem Cervixkarzinom von Henrietta Lacks isoliert [140].

2.2 Plasmaproben des HBV-WHO-Genotypenpanel

Verschiedene Hepatitis-B-Virusisolate aus Patientenseren des HBV Genotypen- sowie des SHBs-Panels der WHO wurden für die Untersuchung der SHBs-Domäne der einzelnen Genotypen verwendet. Um ein vollständiges Set aller Genotypen zu untersuchen, wurde das Gen für das kleine HBV-Hüllprotein (SHBs) des Genotyps „I“ chemisch von der Firma GeneArt, Life Technologies synthetisiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Isolate aus Patientenseren des WHO-Genotypenpanels. Die Zuordnung der Genotypen A bis G erfolgte durch das WHO-Genotypenpanel S2-S15 ([17]). Genotyp H stammte aus dem WHO-SHBs-Panel ([141]). Das SHBs des Genotyp I wurde bei GeneArt AG, Regensburg synthetisiert.

Bezeichnung WHO-Panel	Laborinterne Bezeichnung	Genotyp	HBsAg Subtyp	HBV-DNA (GE/ml)	Herkunft
S2	N4542	A1	adw2	$1,6 \times 10^{10}$	Südafrika
S3	N4879	A2	adw2	$3,4 \times 10^9$	Deutschland
S4	N4214	B1	adw2	$5,3 \times 10^8$	Japan
S5	N4222	B2	adw2	$8,9 \times 10^8$	Japan
S7	N4227	C2	adr	$2,0 \times 10^9$	Japan
S10	N4203	D1	ayw2	$4,2 \times 10^9$	Deutschland
S11	N4595	D3	ayw2	6×10^8	Südafrika
S13	N4881	E	ayw4	$9,5 \times 10^8$	Westafrika
S14	N4494	F2	adw4	$1,6 \times 10^7$	Brasilien
S15	V1659	G	adw2	$1,4 \times 10^7$	Deutschland
I*	K1688	H	adw4	$1,4 \times 10^8$	Deutschland
---	---	I	adr	---	Synthese

2.3 Plasmide

2.3.1 pCEP-Puro

Das eukaryotische Expressionsplasmid pCEP-Puro basiert auf dem Plasmid pCEP4 der Firma Invitrogen (V044-50), enthält aber statt der Hygromycin B-Resistenz eine Resistenz gegen Puromycin, die von A. Geipel einkloniert wurde [131]. Das Plasmid beinhaltet einen CMV-Promotor, sowie eine SV40 Poly-Adenylierungsstelle. Zudem enthält es den OriP des Epstein-Barr-Virus und den EBNA-1-ORF, der essentiell für eine episomale Replikation des Plasmids während des Zellzyklus ist. Für die Selektion in Bakterien enthält das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz.

2.3.2 pCH-9-3091

Bei dem Plasmid pCH9-3091 handelt es sich um ein HBV-Expressionsplasmid für eukaryote Zellen. Es enthält ein 1.1-faches Überlängenkonstrukt des HBV Genotyp D, Subtyp ayw3 mit einem vorgeschalteten CMV-Promotor [28]. In der Zellkultur können humane Hepatomzelllinien, die mit diesem Plasmid transfiziert sind, infektiöses HBV produzieren und sekretieren. In den hier durchgeführten Versuchen dient dieses Plasmid als Wildtyp-HBV DNA. Für die Selektion in Bakterienzellen enthält es zudem eine Ampicillin-Resistenz. Für die Selektion in Bakterienzellen enthält es zudem eine Ampicillin-Resistenz.

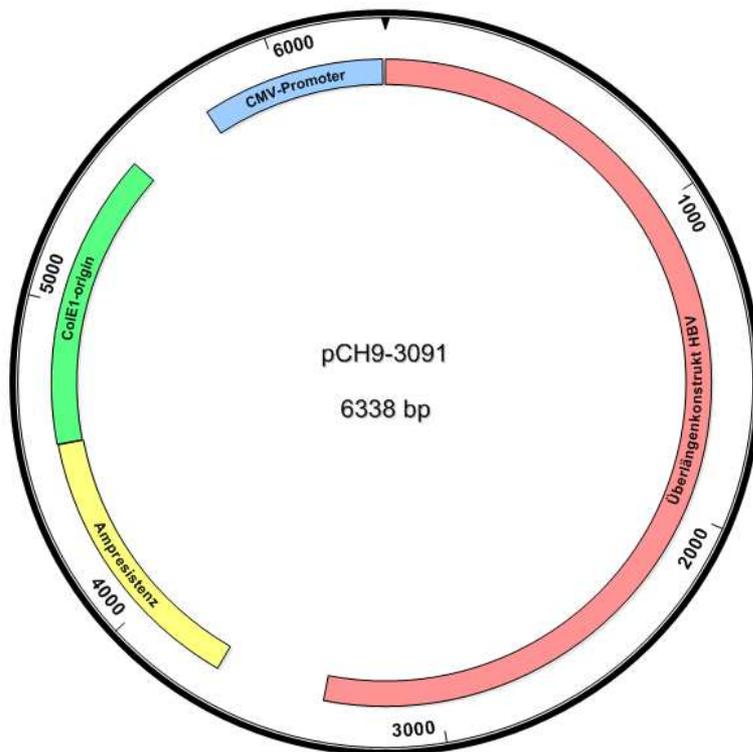


Abbildung 7: Karte des Plasmids pCH9-3091. Das Plasmid enthält ein 1.1er HBV Überlängenkonstrukt (rot), welches unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV) -Promotors (blau) steht. Zusätzlich dazu ist eine Ampicillin-Resistenz (gelb) und der prokaryotische Replikations-Ursprung ColEI-*origin* (grün) kodiert.

2.4 PCR-Primer

Primer für die Amplifikation des SHBs aus den Virusisolaten des WHO-Genotypen-Panels:

Genotyp	Name	Sequenz
A1	HBs-A1-fwd	5'gtcgacggtaccaatctcctcgaggactggg3'
	HBs-G-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
A2	HBs-A2-fwd	5'gtcgacggtaccaatctccgcgaggactgg3'
	HBs-G-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
B2	HBs-B1-fwd	5'gtcgacggtaccgctcaatcttatcgaagactggg3'
	HBs-B1-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
B2	HBs-B1-fwd	5'gtcgacggtaccgctcaatcttatcgaagactggg3'
	HBs-B1-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
C2	HBs-C2-fwd	5'gtcgacggtacccaatcttctcgaggactggg3'
	HBs-C2-rev	5'gctagcgcggccgcccagcgttggtttattagg3'
D1	3091-S-Cloning-fwd	5'gtcgacggtacccaatcttctcgaggattggg3'
	3091-S-Cloning-rev	5'gctagcgcggccgccccatctctttgttttagg3'
D3	3091-S-Cloning-fwd	5'gtcgacggtacccaatcttctcgaggattggg3'
	3091-S-Cloning-rev	5'gctagcgcggccgccccatctctttgttttagg3'
E	3091-S-Cloning-fwd	5'gtcgacggtacccaatcttctcgaggattggg3'
	HBs-E-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
F2	HBs-H-fwd	5'gtcgacggtaccatcaatcttctcgaagactgg3'
	HBs-F3-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
G	HBs-G-fwd	5'gtcgacggtacccaatcttctccaggattggg3'
	HBs-G-rev	5'gctagcgcggccgccccatcttttgttttagg3'
H	HBs-H-fwd	5'gtcgacggtaccatcaatcttctcgaagactgg3'
	HBV-H-rev	5'gctagcgcggccgcccaccattttagctgtg3'

Primer für die gerichtete Mutagenese:

Die roten Buchstaben stehen für die Mutation, die in die Sequenz eingefügt wurde. So bedeutet K118N, dass das Kodon, das für die Aminosäure Lysin (K) an Position 118 in der Polymerase kodiert durch ein Kodon ausgetauscht wurde, das für Asparagin (N) kodiert.

	Name	Sequenz
Resistenzbestimmung	polK118N-fwd	5'gcctgctaggtttatccaaaggttaccaaattttgcc3'
	polK118N-rev	5'ggcaaatatttggaacctttggataaacctagcaggc3'
	polH164R-fwd	5'gagagaacaacacacatagcgcttcattttg3'
	polH164R-rev	5'caaaatgaagcgctatgtgtgtttctctc3'
	polD178K-fwd	5'caccatattctgggaacaagatctacagcatggggcagaatc3'
	polD178K-rev	5'gattctgccccatgctgttagatcttgttccaagaatattggg3'
	150-1 ohne T76S-fwd	5'gtctttaaccctaattggaaaacaccctctttcc3'
	150-1 ohne T76S-rev	5'ggaaaagagggtgtttccaattagggttaaagac3'
	150-1 ohne H73N-fwd	5'cctgtcttaaccctcattggaaatctccc3'
	150-1 ohne H73N-rev	5'gggagattccaatgagggttaaagacagg3'
	150-1 ohne K90E-fwd	5'caccaagacattattaaaaatgtgaacaattttagggcccactc3'
	150-1 ohne K90E-rev	5'gagtgggcctacaaattgtcacatttttaataatgtcttgg3'
	Primer-fwd	5'attcatttacaccaagacattatcaaaaaatgtgaacaattttagggcc3'
	Primer-rev	5'ttgggtaaatgaatattaggaaaagagggtgtttccaatgagggttaaagac aggtacagtag3'
	PrimerinMuc-fwd	5'atcagcgcatgctggaaccttctggctcctctgccgatcc3'
PrimerinMuc-rev	5'cacgcatgctgatggcctatggccaagccccagccagtg3'	

Sequenzierprimer:

Name	Sequenz
CMV-fwd	5'cgcaaattgggtaggcgtg3'
preS1 sense	5'gtcaccaatattcttgggaac3'
SP6	5'atttaggtgacactatagaa3'
Pol sense	5'actcctccagcttatagacc3'
S6 antisense	5'ckttgacadaactttccaatcaatag3' *
Pol antisense	5'atatttggggcggtcacg3'
pCH9-200-forward	5'aaatgctgtaacaactccgc3'
S6 sense	5'tggatgtgtctgcggc3'
X3 sense	5'tttgtttacgtcccgtcg3'
S4as sense	5'ttaccaattttctttgtc3'
pCEP-Puro-reverse	5'agctgcatgtgtcagagg3'
HBV C3as-s	5'gaactccctcgctcg3'

* k steht für die Nukleotide g oder t

Primer für Real Time PCR HBV:

Name	Sequenz
Hope sense	5'actaggaggctgtaggcata3'
Hope antisense	5'agactctaaggcttccc3'

2.5 Kits und Enzyme

Casprofungin Acetat	Sequoia, Pangbourne UK	SRP05500c
Cpol	Thermo Scientific, Schwerte	ER0741
Dpnl	New England Biolabs, Ipswich	R0176S
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, Mannheim	11858874001
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech, France	639643
KpnI	New England Biolabs, Ipswich	R0142S
Kpn21	Thermo Scientific, Schwerte	ER0531
Mph11031	Thermo Scientific, Schwerte	ER0731

NotI	New England Biolabs, Ipswich	R0189S
Pfu Turbo DNA Polymerase	Agilent Technologies, Böblingen	600250-52
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte	F530s
Proteinase K	Abbott, Illinois	3L78-60
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo	28704
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo	28104
QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Scientific, Schwerte	AB-1285/B
HBsAg (Architect)	Abbott, Illinois	6C36-41
Sample Preparation System DNA	Abbott, Illinois	06K12-24
Shrimp Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific, Schwerte	EF0511
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, Schwerte	EL0011
Trypsin/EDTA (5x)	PAA, Pasching	L11-003
XhoI	Thermo Scientific, Schwerte	ER0691

2.6 Puffer und Medien

TAE-Puffer:

2 M Tris-Acetat

5 mM Na₂EDTA

pH 8,0

Lysogeny Broth (LB)-Medium [142]:

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefe-Extrakt

10 g NaCl

Mit dest. H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

Bacto-Agarplatten:

400 ml LB-Medium

7,5 g Bacto-Agar

800 µl Ampicillin (50 µg/ml)

Das LB-Medium wurde zusammen mit dem Bacto-Agar aufgekocht und das Ampicillin zugegeben, nachdem das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt war. Anschließend konnte die Agarose in die Bakterialschalen gegossen werden.

Medien für eukaryote Zellkultur

Zur Kultivierung von immortalisierten Zelllinien wurde Dulbeccos modified Eagle's Medium (DMEM) der Fa. Invitrogen verwendet. Dem Flüssigmedium mit Phenolrot (Katalog-Nr. 41966-029) oder ohne Phenolrot (Katalog-Nr. 21063-029) wurde jeweils fötales Kälberserum (FKS) bis zu einer finalen Konzentration von bis zu 10% zugesetzt. Das FKS wurde von der Firma PAA (Katalog-Nr. P30-3300, Charge 281803) bezogen. Für die phänotypische Untersuchung der Plasmide mit den humanen Hepatom-Zelllinien HuH7 und HepG2 wurde ein FKS der Firma PAA (Katalog-Nr. A15-101, Charge A10112-2262) verwendet. Allen Medien wurde eine Penicillin/Streptomycin-Lösung (PAA, Katalog-Nr. P11-010) zugesetzt. Dem DMEM ohne Phenolrot wurde zusätzlich noch Pyruvat PAA, Katalog-Nr. S11-003) in einer Endkonzentration von 100 mM zugemischt.

PBS:

137 mM NaCl, pH 7,4
 2,7 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 1,8 mM KH₂PO₄

pH 7,4

100 x PBS++:

1,32 g CaCl₂
 2,133 g MgCl₂
 ad 100 ml H₂O

4 ml in 400 ml PBS

Trypsin/EDTA-Lösung:

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

Stocklösungen Nukleos(t)id-Analoga (NA):

2 mM	Adefovir (CAS-Nummer: 106941-25-7)
1 mM	Entecavir (CAS-Nummer: 142217-69-4)
10 mM	Lamivudin (CAS-Nummer: 134978-17-4)
2,5 mM	Tenofovir (CAS-Nummer: 147127-20-6)

Die NA wurden in sterilem Wasser verdünnt und nach dem Aliquotieren bei -70 °C aufbewahrt.

Coomassie-Färbelösung:

2,5 g	Coomassie Brillantblau
450 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure
450 ml	H ₂ O

Entfärber-Lösung:

450 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure
450 ml	H ₂ O

EIA-Beschichtungspuffer:

183 mM	NaCl
8,6 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
2,2 mM	KH ₂ PO ₄

in H₂O; pH 7,4

TNE-Puffer:

140 mM	NaCl
1 mM	EDTA
20 mM	Tris-HCl

in H₂O; pH 7,4

2.7 Antikörper, Antiseren und Nachweisproteine

anti-WHs 2722	polyklonales Kaninchenserum	Detektion des WHsAg	[135]
HB1	monoklonal Herkunft: Maus	konformationsunabhängige Detektion der S-Domäne des HBsAg in der Antigenen Schleife; Bindemotiv: CR/KTCTT (AS 120-125)	Dr. A. Zvirbliené, Vilnius

C20/02	monoklonal Herkunft: Maus	konformationelle Detektion der S-Domäne des HBsAg in der Antigenen Schleife mit unbe- kanntem Bindemotiv (Bereich: AS 120-161)	persönliche Mitteilung W.H. Gerlich, Gießen
Anti-HBs/Biotin Konjugat I	monoklonal	Enzygnost-HBsAg, 6.0	Siemens Healthcare, Eschborn
Streptavidin-POD Konjugat II		Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	DIANOVA, Hamburg

2.8 Chemikalien, Puffer- und Medienzusätze

Adefovir (CAS-Nummer: 106941-25-7)	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
Barbital Puffer	Sigma, Taufkirchen	B5934-12VL
BSA	Sigma, Taufkirchen	A-4378
1 % Blocker Casein in PBS	Thermo Scientific, Schwerte	37528
Coomassie Brilliantblau R250	MERCK, Darmstadt	1125530025
DMEM mit Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe	41966-029
DMEM ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe	21063-029
DNA-Marker 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe	15615-016
dNTP Mix (10mM)	Thermo Scientific, Schwerte	R0192
Entecavir (CAS-Nummer: 142217-69-4)	Sequoia, Pangbourne UK	SRP010887e
Ethanol 70% vergällt	Fischar, Saarbrücken	27660
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg	21238.01
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching	A15-101
FuGene HD	Promega, Mannheim	E2311/2
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe	6781.3
Kollagen Typ I	Becton Dickinson, Heidelberg	354236

Lamivudin (CAS-Nummer: 134978-17-4)	Sequoia, Pangbourne UK	SRP01125I
Loading Dye (6x)	New England Biolabs	B70215
Methylenblau	Roth, Karlsruhe	A514.1
MgCl ₂ Lösung (1 M)	Sigma, Taufkirchen	M1028
OPD Tabletten für EIA	DAKO, Glostrup, Dänemark	S2045
PCR-Wasser	Applichem, Darmstadt	A7398
Penicillin/Streptomycin-Lsg.	PAA, Pasching	P11-010
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Venlo	12943
Puromycin	Roth, Karlsruhe	0240.4
Pyruvat	PAA, Pasching	S11-003
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo	27104
Tenofovir (CAS-Nummer: 147127-20-6)	Sequoia, Pangbourne UK	SRP01194t
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe	7125.1
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe	9090.2
TWEEN 20	Merck, Darmstadt	8170721000

2.9 Geräte

Architect I2000	Abbott, Illinois
Bakterienschüttler Innova 44	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank MCO-19AICUV-PE	Panasonic, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Wetzlar
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer für Laurell	Werkstatt des Mehrzweckinstitutes der JLU Gießen
EIA-Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
EIA-Shaker ZLI 164	Amersham Biosciences, Braunschweig
EIA-Washer COLUMBUS	Tecan Deutschland GmbH
Freedom Evo 100/4D	Tecan, Crailsheim
KühlThermoMixer	HLC, Bovenden
Laborschüttler Swip KS 10	Edmund Bühler, Tübingen
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
Minishaker MS2	MAGV, Rabenau-Londorf
Nivelliertisch	Shandon Scientific, London

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
Stanze für Laurell Agaroseplatten	Werkstatt des Mehrzweckinstitutes der JLU Gießen
Sterilbank KS-12	Thermo Scientific, Schwerte
UV-Transluminator TFX-20M	Vilber-Lourmat, Torcy, FR
Vortexer	IKA, Staufen

2.10 Verbrauchsmaterialien

Bakterienschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Deepwellplatte 2,2 ml 96-Well	Thermo Scientific, Schwerte
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegskalpelle	MAGV, Rabenau-Londorf
Filterpapier WHATMAN 2mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasplatten für Laurell (5 x 7,5 x 0,2 cm)	Kalensee, Gießen
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 Scientific, Schwerte
PCR-Tubes 0,2 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml für Freedom Evo	Neolab, Heidelberg
Reaktionsgefäße FALCON 15ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Rundbodenplatten 96-Well	Thermo Scientific, Schwerte
Zellkulturschalen 24 well, Maxi, 10 cm, 96-Well	BD Biosciences, Heidelberg

3. Methoden

3.1 Extraktion von Virus-DNA aus humanem Serum

Virale DNA aus Patientenseren des WHO-Genotypen-Panels [17] oder aus Zellkulturüberständen wurden mit dem High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit von Roche aufgereinigt. Dabei erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben. Es wurden 10 – 200 µl Serum eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der Lyse der Virionen und dem Verdau der Proteine an der Nukleinsäure durch die Proteinase K. Die DNA bindet dann an eine Säule. In mehreren Waschschrritten werden die restlichen Komponenten entfernt und die gereinigte DNA anschließend in sterilem Wasser eluiert.

3.2 Klonierung

3.2.1 Klonierung des SHBs aus viraler DNA des WHO-Genotypen-Panels in pCEP-Puro

Für die Klonierung des SHBs wurde zunächst die aus Patientenseren extrahierte virale DNA über eine PCR amplifiziert. Dazu wurden verschiedene Primer verwendet, die spezifisch an die DNA des SHBs des jeweiligen Genotyps binden (siehe 2.4). Dabei wurde die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase verwendet, welche aufgrund ihres *proof-readings* eine sehr geringe Fehlerrate von 4.4×10^{-7} aufweist. Nach dem Erhitzen auf 80°C wurde der *Hotstart-Mix* direkt zu den Ansätzen in den Thermocycler gegeben. Die *Annealing*-Temperatur wurde anhand der Schmelztemperatur (T_m) gewählt ($T_m - 3^\circ\text{C}$).

PCR-Mix 1x:

24 µl	H ₂ O
10 µl	5x HF-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
3 µl	Primer fwd (10 pmol/µl)
3 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
5 µl	Virus-DNA
5 µl	<i>Hotstart-Mix</i>

PCR-Programm:

1 min	98 °C	1x	
30 s	80 °C	1x	Zugabe <i>Hotstart-Mix</i>
1 min	98 °C	1x	
10 s	98 °C	} 35x	
30 s	X °C		
20 s/kb	72 °C		
10 min	72 °C	1x	

Hotstart-Mix: 3,5 µl H₂O

1 µl 5x HF-Puffer

0,5 µl DNA Polymerase

Zur Kontrolle, ob die PCR erfolgreich war und ein Produkt mit der erwarteten Größe amplifiziert wurde, wurden 3 µl des PCR-Produkts in einem 1 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt (siehe 3.3). Bei dem erwünschten Ergebnis wurde das restliche PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Das Gelstück wird dazu in dem mitgeführten GQ-Puffer verflüssigt und durch eine Säule zentrifugiert, wobei die DNA an die Säule bindet. Die übrigen Bestandteile werden in mehreren Waschschritten entfernt und die DNA dann in 30 µl Wasser eluiert.

Anschließend wurde die eluierte DNA, im folgenden Insert genannt, sowie 4 µg des Vektors pCEP-Puro jeweils mit 2 µl der Restriktionsenzyme KpnI und NotI verdaut. Zu den einzelnen Ansätzen wurden 2 µl BSA und 4 µl Puffer 4 von NEB zugegeben und für ein Volumen von insgesamt 40 µl mit H₂O aufgefüllt. Der enzymatische Verdau des Inserts erfolgte für 2 h bei 37 °C. Der Vektor wurde zunächst für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Enzyme danach für 15 min bei 80 °C inaktiviert. Anschließend wurden, um eine Religation des Vektors zu vermeiden, 2,5 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) mit 2,5 µl SAP-Puffer zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dadurch wurden die 5'- und 3'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Nach dem Verdau wurden beide Ansätze für 15 min bei 80 °C zusammen mit SDS-haltigem 6x Ladepuffer inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Proben wurden anschließend auf ein 1 %-iges Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen und nach dem Lauf für etwa 15 min mit 2%-iger Methylenblaulösung gefärbt. Methylenblau dient hierbei als Farbstoff, um die DNA anzufärben. Im Vergleich zu Ethidiumbromid ist es zwar weniger sensitiv, aber durch den Nachweis ohne die Bestrahlung mit UV-Licht kann die DNA anschließend weiterverwendet werden. Danach wurde das Gel mit Wasser soweit entfärbt, bis die jeweiligen Banden sichtbar waren, die daraufhin mit einem Skalpell ausgeschnitten wurden. Die DNA aus den Gelstücken wurde anschließend mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen eluiert. Daraufhin erfolgte die Ligation des Vektors mit dem Insert in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 für 20 min bei RT. Dazu wurden jeweils 1 µl der T4 DNA Ligase und 2 µl des Ligasepuffers zu dem Ansatz gegeben und mit Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Die ligierten Proben wurden anschließend wie in 3.5 beschrieben in kompetente *E. coli* transformiert. Mit den gewachsenen Klonen wurden daraufhin wie in 3.6 beschrieben *E. coli*-Flüssigkulturen beimpft und die DNA isoliert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend zur Kontrolle durch die Firma LGC Genomics sequenziert (siehe 3.7).

3.2.2 Klonierung verschiedener Domänen der HBV-Polymerase des Patientenklons 150-1 in pCH9-3091

Für die genaue Identifikation bestimmter Resistenzmuster wurden verschiedene Klone hergestellt, die aus unterschiedlichen Kombinationen der Polymerase-Domänen des Patientenklons 150-1 und des Wildtyps pCH9-3091 sowie des Klons Muc38 bestehen.

Für die Klonierung der RNaseH-Domäne wurden die entsprechenden Plasmide mit jeweils 2 µl der Enzyme Cpol und Mph1103I zusammen mit 4 µl Tangopuffer in einem Volumen von 40 µl für 1 h inkubiert. Ein Ansatz wurde anschließend mit 2,5 µl SAP und 2,5 µl SAP-Puffer behandelt. Dabei erfolgte für 1 h bei RT die Dephosphorylierung der DNA-Enden, um eine Religation zu vermeiden. Anschließend wurden beide Ansätze in Anwesenheit von SDS-haltigem 6x Ladepuffer für 15 min bei 80 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Proben wurden daraufhin auf ein 1-%iges Agarosegel aufgetragen und nach dem Lauf mit Methyleneblau gefärbt. Der weitere Verlauf erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben.

Für die Klonierung der Primer- und Spacer-Domäne wurden die Plasmide 150-1, pCH9-3091 bzw. Muc38 jeweils mit 2 µl der Enzyme XhoI und Kpn21 zusammen mit je 4 µl Tango-Puffer in einem Volumen von 40 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

3.3 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen:

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nachdem die flüssige Agarose für kurze Zeit abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml Stocklösung) mit einer Verdünnung von 1 : 10.000 zugegeben und die Agarose in eine Kammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels für etwa 45 min bei RT wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer durchmischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Der Lauf erfolgte bei 100 V in 1x TAE-Puffer. Bei Gelen, die nach dem Lauf mit Methyleneblau gefärbt wurden, wurde kein Ethidiumbromid zu der Agarose zugegeben.

3.4 Gerichtete Mutagenese zum Einfügen definierter Mutationen

Um einzelne Mutationen in ein Plasmid einzufügen, wurde die Methode der gerichteten Mutagenese durchgeführt. Dazu wurden komplementäre Primerpaare verwendet, die die gewünschte Mutation jeweils in der Mitte des Primers aufweisen. Diese Primer sollten mindestens eine Schmelztemperatur von 75 °C aufweisen und einen GC-Gehalt von wenigstens 40 % haben. Die Länge der Primer liegt zwischen 30 und 50 Basenpaaren.

Mit diesen Primern wurde anschließend eine PCR durchgeführt, wodurch die gewünschte Mutation bei der Amplifikation in die DNA eingefügt wurde.

PCR-Mix 1x:		PCR-Programm:			
28 µl	H ₂ O	30 s	95 °C	1x	
5 µl	10x Cloned Pfu Reaction Buffer	30 s	95 °C	} 18 x	
5 µl	Plasmid (10 ng/µl)	1 min	55 °C		
5 µl	Primer fwd (25 ng/µl)	1 min/kb	68 °C		
5 µl	Primer rev (25 ng/µl)	10 min	72 °C	1x	
1 µl	dNTPs (10 mM)				
1 µl	Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/µl)				

Um die parentale, methylierte DNA abzubauen wurden nach der PCR zu jedem Ansatz 2 µl DpnI sowie 5 µl 10x-Tango-Puffer (33 mM Tris-Acetat (pH 7.9 bei 37°C), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA) zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 80 °C.

Für die anschließende Transformation wurden dann 10 µl des Ansatzes eingesetzt. Die weitere Durchführung der Transformation erfolgte wie in 3.5 beschrieben. Die Plasmidpräparation aus den Klonen wurde wie in 3.6, durchgeführt. Um zu kontrollieren, ob die Methode erfolgreich war, wurde das Plasmid anschließend bei LGC Genomics ansequenziert (siehe 3.7) und im Sequenzvergleich analysiert.

3.4.1 Gerichtete Mutagenese mittels des In-Fusion HD - Klonierungskits

Um mehrere Mutationen gleichzeitig einzufügen, die alle in einem Bereich von bis zu 80 bp liegen, wurde die gerichtete Mutagenese mittels In-Fusion HD durchgeführt. Die Methode der Klonierung mit dem In-Fusion HD Cloning Kit wurde bereits in der Arbeit von A. Geipel am Institut für Medizinische Virologie beschrieben [131]. Sie wurde hier in eigenen Worten zusammengefasst. Dazu wurden 4 Primer verwendet, von denen jeweils zwei Primer um 15 bp im 5'Ende überlappen. Die *Annealing*-Temperatur sollte etwa 3 °C weniger als die Schmelztemperatur der Primer betragen. So werden in zwei PCRs zwei überlappende DNA-Teile hergestellt, die anschließend mit dem In-Fusion HD Cloning Kit zu einem Plasmid mit den gewünschten Mutationen vereinigt werden. Dabei handelt es sich um ein Kit, mit dem Klonierungen ohne Restriktionsenzyme spezifisch durchgeführt werden können, dessen genaue Methode vom Hersteller jedoch nicht bekannt gegeben wird.

PCR-Mix 1x:	PCR-Programm:
20,5 µl H ₂ O	1 min 98 °C 1x
10 µl 5x HF-Puffer	30 s 80 °C 1x Zugabe <i>Hotstart-Mix</i>
1 µl dNTPs (10 mM)	1 min 98 °C 1x
3 µl Primer fwd (10 pmol/µl)	10 s 98 °C
3 µl Primer rev (10 pmol/µl)	30 s X °C
2,5 µl DMSO	20 s/kb 72 °C
5 µl <i>template</i>	10 min 72 °C 1x
5 µl <i>Hotstart-Mix</i>	

Hotstart-Mix:

3,5 µl H ₂ O
1 µl 5x HF-Puffer
0,5 µl <i>Phusion</i> DNA Polymerase

Nach der PCR wurde zur Kontrolle, ob das PCR-Produkt die richtige Größe hat, jeweils 5 µl der Probe auf einem 1 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt (siehe 3.3). Anschließend wurde die restliche Probe auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, das dann mit Methylenblau angefärbt wurde (siehe 3.3). Die Banden mit der richtigen Größe wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mithilfe des Gel Extraction Kit von Qiagen aus den Gelstücken eluiert. Daraufhin wurden beide Ansätze im molaren Verhältnis von 1 : 2 zusammen mit 2 µl des In-Fusion Enzymmixes für 15 min bei 50 °C inkubiert. Dabei

betrug das Endvolumen 12 μl . Anschließend wurden 2 μl des Ansatzes für die Transformation eingesetzt (siehe 3.5).

3.5 Transformation von Plasmid DNA in *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde eine Transformation in kompetente Stellar Bakterienzellen durchgeführt. Dabei wurden in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 2 μl der jeweiligen Plasmid-DNA (ca. 0,1 – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 45 μl der Bakterienzellen pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 40 s bei 42 °C. Danach wurden die Zellen nochmal für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zu jedem Ansatz 250 μl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C im Bakterenschüttler inkubiert. Nach dieser Zeit wurden jeweils 20 μl und 200 μl auf LB-Amp-Platten verteilt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (über Nacht, 12-14 h).

3.6 Plasmidpräparation von Plasmiden aus *E. coli*

Um nach einer Transformation die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Für kleinere DNA Mengen (Minipräp) wurde das Plasmid Plus Mini Kit von Qiagen, für größere DNA Mengen (Midipräp) das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden mit einem sterilen Zahnstocher Einzelkolonien von den LB-Platten gepickt und in 5 ml (Minipräp) bzw. 40 ml (Midipräp) LB-Medium mit Ampicillin über Nacht im Bakterenschüttler bei etwa 200 rpm inkubiert. Beide Kits wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterienzellen und deren Lyse werden die Proteine denaturiert und physikalisch von den Nukleinsäuren getrennt (Zentrifugation bzw. Filterspritze). Die Lösung wurde dann über eine Säule gegeben, an die die DNA bindet, welche anschließend eluiert werden kann. Die Bindung der DNA an die Silikamembran der Säule erfolgt bei hoher Salzkonzentration. Die anschließende Elution wird bei geringer Salzkonzentration durchgeführt. Bei einer Minipräp mit *high-copy* Plasmiden liegt anschließend ein Volumen von 50 μl mit einer DNA Konzentration von typischerweise etwa 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$ vor (Ausbeute etwa 15 μg), wohingegen bei einer Midipräp ein Volumen von 200 μl mit einer DNA Konzentration von circa 800 $\text{ng}/\mu\text{l}$ anfällt. Bei *low-copy* Plasmiden kann die DNA-Konzentration um den Faktor 5 bis 10 geringer sein. In einigen Fällen erfolgte eine Sequenzierung der isolierten Plasmide durch LGC Genomics (siehe 3.7).

3.7 Sequenzierung von Plasmiden

Für eine Sequenzierung der gereinigten Plasmide wurden die Proben an die Sequenzierfirma LGC Genomics in Berlin geschickt. Dazu wurden, wie von der Firma vorgegeben, jeweils 30 µl der entsprechenden Plasmide mit einer Konzentration von 100 ng/µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verdünnt. Die jeweiligen Primer wurden mitgeliefert oder direkt von der Firma synthetisiert.

3.8 Kultivierung von Zelllinien

3.8.1 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen im Spezialtank für flüssigen Stickstoff (-196°C) in der Gasphase aufbewahrt. Um die Zellen aufzutauen, wurden sie aus dem Stickstofftank entnommen und kurz (max. 1 Minute) im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben, in welche bereits 10 ml vorgewärmtes DMEM mit 10 % FKS und Phenolrot vorgelegt wurde. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Zellen auf der Platte verteilt und mit dem Medium gemischt. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale angeheftet hatten, wurde nach etwa 4 h das Medium gewechselt, um das enthaltene DMSO und tote Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 7 % CO₂ und 96 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Um die Zellen zu passagieren, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und 10 ml vorgewärmtes PBS zugegeben. Nach leichtem Schwenken wurde das PBS abgesaugt und 1 ml einer 5 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, welches durch Schwenken auf der ganzen Platte verteilt wurde. Anschließend wurde die Platte für etwa 5 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Die Zellen konnten dann mit vorgewärmtem 5%-igem FKS DMEM mit Phenolrot resuspendiert und der entsprechende Anteil auf neue Zellkulturplatten überführt werden. Danach wurde das Volumen mit 5%-igem FKS DMEM mit Phenolrot auf 10 ml aufgefüllt. Für ein besseres Anheften der Zellen wurden die Zellkulturschalen für HepG2-Zellen zuvor mit Kollagen Typ I (2 mg/ml) beschichtet. Idealerweise wurden diese Zelltypen mit einer minimalen Dichte von etwa 50 % gehalten.

3.8.2 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

Um die Zellen zu transfizieren wurden diese am Vortag passagiert, sodass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 80 % vorlag. Für jede 10 cm Zellkulturschale wurden 8 µg gereinigte Plasmid-DNA mit 350 µl vorgewärmtem DMEM mit Phenolrot ohne FKS gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde 32 µl FuGene HD Transfektionsreagenz zugegeben und stark gemischt. Die Ansätze wurden anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellkulturplatten abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit circa 10 ml vorgewärmtem PBS⁺⁺ gewaschen, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurde jeweils 10 ml vorgewärmtes 2 %-iges FKS DMEM mit Phenolrot auf die Zellen gegeben und die Zellen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank gelagert. Nach der Inkubationszeit des Transfektionsansatzes wurde dieser vorsichtig und gleichmäßig auf die Zellkulturschale ausgetropft und die Flüssigkeit leicht geschwenkt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 24 h wurde das Medium mit dem Transfektionsreagenz entfernt und durch neues 2 %-iges FKS DMEM ersetzt.

3.9 Herstellung stabiler Zelllinien

Um größere Mengen an subviralen Partikeln des HBV zu produzieren, die nur aus dem kleinen HBV-Oberflächenprotein (SHBs) bestehen, wurden verschiedene klonierte SHBs-Gene unterschiedlicher HBV-Genotypen des WHO-Genotypen-Panels mit dem Vektor pCEP-Puro in unterschiedliche Zelllinien transfiziert (siehe 3.8.2). Der Vektor pCEP-Puro hat die Eigenschaft, sich episomal in eukaryoten Zellen mit dem Zellzyklus zu replizieren, und verleiht den Zellen eine Resistenz gegenüber einer Selektion mit dem Antibiotikum Puromycin. Dieser Vektor wurde von der Fa. Invitrogen bezogen (Kat.-Nr. V044-50) und von A.Geipel modifiziert [131]. Durch Zugabe von 3 µg/ml Puromycin mit 10 %-igem FKS DMEM ohne Phenolrot wurden die Zellen ausselektiert, die nicht mit dem Plasmid transfiziert waren. Der Überstand wurde in der ersten Woche täglich gewechselt, bis sich erste Zellklone zeigten bzw. alle Zellen der mitgeführten Kontrollplatte, die mit einem Plasmid ohne Puromycin-Resistenz transfiziert wurde, gestorben waren.

3.10 Phänotypische Bestimmung der antiviralen Resistenz von HBV-Varianten in der Zellkultur

Wesentliche Teile dieses Assays wurden bereits in der Doktorarbeit von A. Geipel, einem ehemaligen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Virologie beschrieben und werden hier verkürzt in eigenen Worten wiedergegeben [131].

3.10.1 Kultivierung von Hepatom-Zelllinien in Anwesenheit von antiviral wirkenden Nukleos(t)id-Analoga

Um die Resistenzmuster der verschiedenen Klone zu untersuchen, wurden diese in einem phänotypischen Assay in Zellen wie in 3.8.2 beschrieben, transfiziert. Dazu wurden Huh7 und HepG2-Zellen verwendet. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgelöst, indem sie für etwa 5 min mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 20 ml 2 %-igem FKS DMEM mit Phenolrot überführt. Nachdem der Ansatz durch Invertieren gemischt wurde, wurden die Zellen für 6 min mit 60 g bei RT abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgeschüttet, sodass sich das Zellpellet nicht löst. Die Zellen wurden dann erneut in 25 ml 2 %-igem FKS DMEM mit Phenolrot resuspendiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und neues Medium zugegeben. Nach dem Resuspendieren wurde der gesamte Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um die Verunreinigungen des Reaktionsgefäßes mit HBV DNA nicht weiter mitzuführen. Nun wurde der Ansatz erneut abzentrifugiert und die Zellen dann je nach Größe des Pellets in 15 – 20 ml 2 %-igem FKS DMEM ohne Phenolrot resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach den Waschschritten auf 96-Well Platten mit je 100 µl/ Well ausgesät. In diesen Zellkulturschalen lagen bereits jeweils 100 µl/ Well der zuvor verdünnten Nukleos(t)id-Analoga (NA) vor. Diese wurden in 2 %-igem FKS DMEM ohne Phenolrot angesetzt (Tabelle 2). Je nach Versuchsansatz wurden drei bzw. sechs Verdünnungsreihen mit 5 bzw. 6 Verdünnungen aufgetragen. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurde bei jedem Versuch jeweils ein Wildtypansatz (pCH9-3091) mitgeführt.

Tabelle 2: Pipettierschema der NA für den Phänotypischen Assay. A: Verdünnungsreihen für die NA Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir in dreifach-Ansätzen. B: Verdünnungsreihen für die NA Entecavir und Tenofovir in sechsfach-Ansätzen.

A

	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	0,002 µM			0,02 nM			0,002 µM			0,064 µM		
G	nicht inhibiert											
H												

B

	Entecavir						Tenofovir					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000 nM						200 µM					
B	200 nM						40 µM					
C	20 nM						8 µM					
D	2 nM						1,6 µM					
E	0,2 nM						0,32 µM					
F	nicht inhibiert											
G												
H												

Die Zellen wurden anschließend für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Überstände abgenommen, weiterverarbeitet und die Platte zusammen mit den Zellen verworfen.

3.10.2 Aufreinigung der viralen DNA mit dem Pipettierautomaten Freedom EVO 100 von Tecan

Die virale DNA wurde aus jeweils 100 µl Zellkulturüberstand mit dem Pipettierautomaten Freedom EVO 100 von Tecan mit dem Sample Preparation System DNA Kit der Firma Abbott nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Viruspartikel wurden dabei mit dem Lysepuffer lysiert, woraufhin die Bindung der DNA an magnetische Mikropartikel erfolgte. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA mit jeweils 100 µl Wasser in eine Mikrotiterplatte eluiert.

3.10.3 Quantifizierung der viralen DNA durch die Light Cycler Real Time PCR

Nach der Aufreinigung der viralen DNA aus den Proben wurde die DNA mithilfe einer diskriminativen Light Cycler Real Time PCR quantifiziert. Dabei sind die Primer so gewählt, dass die für die Transfektion eingesetzte Plasmid-DNA 1000-mal schlechter amplifiziert wird, als die virale DNA. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Abstand zwischen den Primern in der HBV DNA nur 400 bp beträgt, wohingegen in der Plasmid-DNA der Abstand der Primer ca. 4000 bp beträgt. Da die Elongationszeit nur 10 s beträgt, wird die virale DNA sehr viel effektiver amplifiziert.

Für die PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Dieser weist unspezifisch doppelsträngige DNA nach und lagert sich in die kleine Furche der DNA. Der Komplex aus DNA und SYBR Green emittiert nach Anregung grünes Licht bei einer Wellenlänge von etwa 520 nm. Frei vorliegendes SYBR Green wird 1000-mal schlechter angeregt. Daher kann die DNA Menge proportional aus der gemessenen Fluoreszenz bestimmt werden.

PCR-Mix 1x:

8 µl QPCR SYBR Green Capillary Mix (3 mM MgCl₂)

1 µl Hope sense (10 pmol/µl)

1 µl Hope antisense (10 pmol/µl)

Der PCR-Mix wurde in eine 96-Well-PCR-Platte vorpipettiert und anschließend jeweils 10 µl der Probe dazugegeben. Für die Quantifizierung wurden zusätzlich zu den Proben je zwei Standardreihen aus Zellkultur-Virus des Wildtyps (pCH9-3091) aufgetragen. Zur Entfernung von Luftblasen wurde die PCR-Platte für 2 min bei 700 g abzentrifugiert. Anschließend erfolgte der Lauf im Light Cycler (Tabelle 3).

Tabelle 3: Programm der Light Cycler PCR zur Quantifizierung von HBV DNA

	Aktivierung/ Denaturierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Zyklen	1	40			1			1
Typ	regulär	Quantifikation			Schmelzkurve			regulär
Temperatur (°C)	95	95	60	72	95	60	95	40
Inkubationszeit	15 min	15 s	10 s	20 s	10 s	15 s	---	30 s
Temperatursteigerung (°C/s)	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	2,2	0,1	2,2
Messung	---	---	---	einmalig	---	---	kontinuierlich	---

3.10.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Um relative Replikationswerte zu erhalten, wurde zunächst der Mittelwert aus den nicht inhibierten Werten, sowie deren Standardabweichung berechnet. Dieser Wert diente dann als Referenz und wurde gleich 100 % gesetzt. Für die Auswertung wurden jeweils gleiche Klone aus mehreren Ansätzen zu einem Konsensus zusammengefasst. Von jeder Konzentration wurden aus den jeweiligen Datenpunkten eines Klons der Mittelwert und die Standardabweichung sowie der Standardfehler bestimmt. Die relative Replikation eines Klons wurde dann anhand der nicht inhibierten Werte berechnet. Mit den relativen Werten konnte dann eine nicht lineare Regression mit der in Abbildung 8 beschriebenen Regressionsformel mit dem Programm Sigma Plot 8.0 durchgeführt werden. Daraus konnten dann die inhibitorische Konzentration IC_{50} bestimmt werden. Dabei handelt es sich um die Konzentration, bei der die Replikation 50 % der nicht inhibierten Proben beträgt. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf die Werte des Konsensus des Wildtyps und wurde aus dem Quotienten der IC_{50} des Wildtyps und der IC_{50} des jeweiligen Klons berechnet (Abbildung 8).

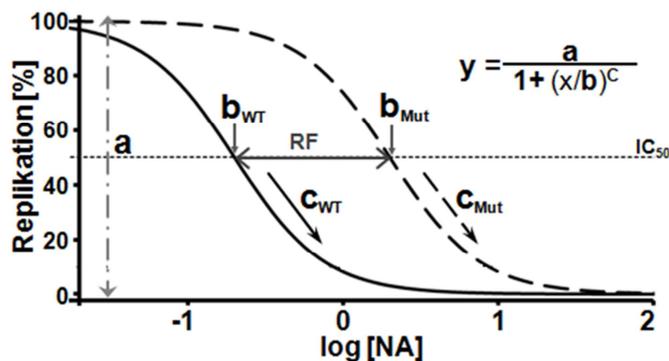


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Regressionskurve des Wildtyps (WT) und eines Klons (Mut) als sigmoidale Kurve zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration IC_{50} und des Resistenzfaktors (RF). Die nicht lineare Regression wurde anhand der Formel oben rechts ermittelt. Dabei beschreibt der Parameter a den Abstand zwischen maximaler und keiner Inhibition, der Parameter b den Wendepunkt und der Parameter c die Steigung der Kurve (Verändert nach A. Geipel 2013).

Um zu ermitteln, ob der RF signifikant ist und damit die Werte, die zur Ermittlung der jeweiligen Inhibitionskurve verwendet wurden, signifikant auseinanderliegen, wurde eine ANOVA mit dem Programm SPSS Statistics 21 von IBM durchgeführt. Für die Analyse wurden die nicht inhibierten Werte bewusst nicht mit einbezogen.

3.11 Quantitative Bestimmung des WHsAg mit der Laurell-Elektrophorese

Wesentliche Teile der Durchführung der Laurell-Elektrophorese wurden bereits in der Doktorarbeit von H. Lorenz, einer ehemaligen Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Virologie beschrieben und sind hier in eigenen Worten zusammengefasst [143],[135],[136],[137].

3.11.1 Prinzip der Laurell-Elektrophorese

Bei der Laurell-Elektrophorese handelt es sich um eine Kombination aus Immunpräzipitation und Elektrophorese. Mit dieser Methode können spezifisch Antigene aus Serum oder Plasma nachgewiesen und mithilfe eines Standards quantifiziert werden [136]. In diesem Fall wurde das Oberflächenantigen (WHsAg) des Woodchuck Hepatitis-B-Virus (WHV) untersucht. Das Antigen wird auf ein Agarosegel aufgetragen. Wird eine Spannung angelegt, wandert das Antigen durch das elektrische Feld von der Kathode zur Anode durch die Antikörper-haltige Agarose. An Stellen, wo das Antigen und der stationär verbleibende Antikörper in äquivalenten Mengen aufeinandertreffen, kommt es zur Bildung von Präzipitationsbögen. Anhand der Höhe der Bögen kann man proportional auf die Antigenkonzentration schließen. Das Antigen und der Antikörper müssen im richtigen Verhältnis zueinander vorliegen. Ist das Antigen im Überschuss vorhanden, bilden sich offene Präzipitationsbögen. Bei einer zu hohen Antikörperkonzentration werden die Bögen zu kurz. Vorteil dieser Methode ist, dass eine Quantifizierung von Antigen in einem relativ hohen Konzentrations-Bereich von 0,5 – 100 µg/ml (siehe 4.2) möglich ist.

3.11.2 Durchführung der Laurell-Elektrophorese

Für die Laurell-Elektrophorese wurden die Glasplatten zunächst gesäubert und mit 70 %-igem Ethanol entfettet. Anschließend wurde auf dem Nivelliertisch 6 ml der aufgekochten 0,6 %-igen Agarose in Barbitallpuffer vorsichtig auf den Platten verteilt. Nach dem Erhärten der Agarose wurden der Mittelstreifen und 9 Löcher mit einer Stanze ausgeschnitten (Abbildung 10). Mit einem Spatel wurde der Mittelteil abgestreift und die Agarose aus den Löchern mit einem Unterdrucksystem und einer Kanüle abgesaugt. Die 0,6 %-ige Agaroselösung wurde im Wasserbad auf 60 °C abgekühlt und anschließend pro Ansatz 3 ml Agaroselösung mit 80 µl anti-WHsAg Antiserum gemischt, sodass keine Luftblasen entstehen. Dieses Gemisch wurde daraufhin direkt auf den freien Mittelstreifen der Glasplatte gegossen. Während die Agarose auf den Platten fest wurde, wurden etwa

900 ml Barbitalpuffer in die Elektrophoresekammer gefüllt (Abbildung 9). Nach dem Erhärten der Agarose wurden die Platten in die Kammer gelegt, sodass die Stanzlöcher zur Kathode zeigten. Anschließend wurden Filterpapiere in Barbitalpuffer angefeuchtet und an beiden Längsseiten der Platten aufgelegt, sodass eine Verbindung des Puffers mit den Platten vorlag. Danach konnten je 10 µl der Probe bzw. des Standards in die Stanzlöcher pipettiert werden. Je nach Bedarf wurden die Proben zuvor in FKS verdünnt. In jedem Lauf wurde eine Platte mit einer Standardreihe mitgeführt. Zur Quantifizierung musste auf jeder Platte mit Proben ein Standardserum bekannter Verdünnung aufgetragen werden, wodurch das eventuell unterschiedliche Laufverhalten der einzelnen Platten berücksichtigt wurde. Der Lauf erfolgte anschließend für 16 h mit konstant 5 mA Stromstärke pro Agaroseplatte.

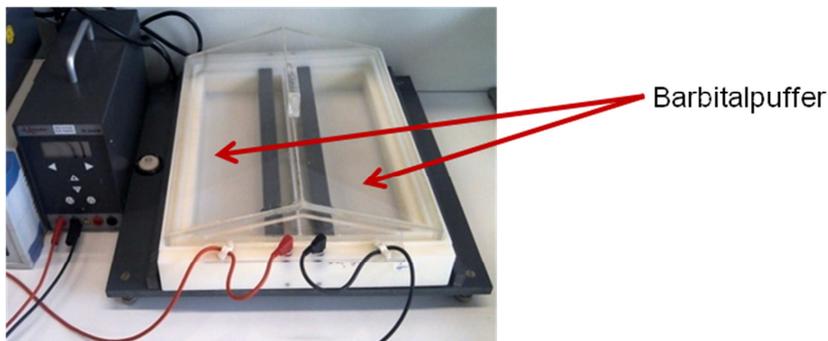


Abbildung 9: Aufbau der Laurell-Elektrophoresekammer mit Stromquelle.

Die Agaroseplatten wurden nach dem Lauf getrocknet. Dazu wurden zunächst 2 Lagen Filterpapier auf die Platten gelegt und leicht gepresst. Danach wurden sie bei RT weiter getrocknet. Um die Präzipitationsbögen sichtbar zu machen, wurden die Platten für etwa 5 min in Coomassie Färbelösung geschwenkt und der Hintergrund anschließend mit Entfärber entfärbt (Abbildung 10).

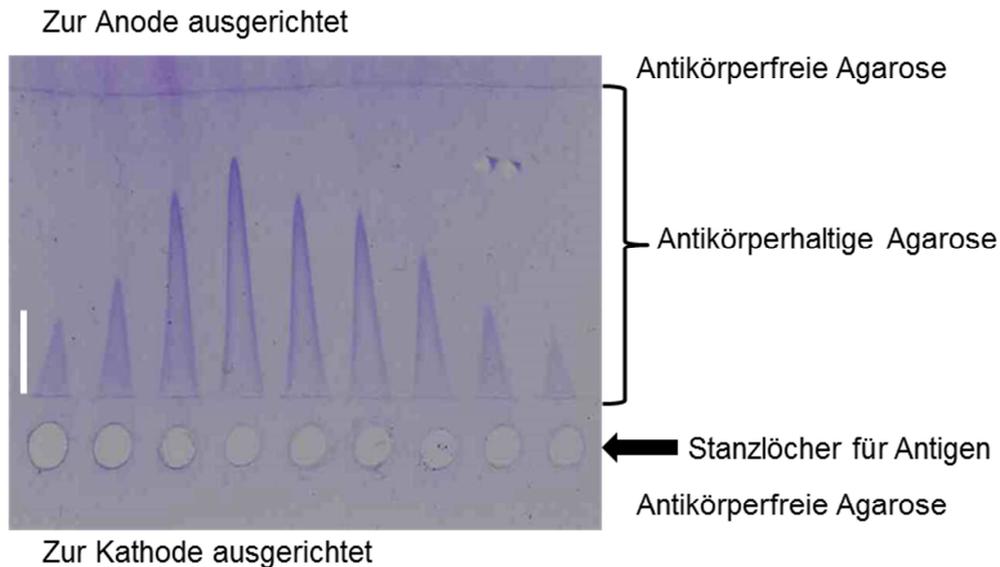


Abbildung 10: Darstellung einer Laurell-Elektrophorese nach dem Lauf und der Färbung mit Coomassie. Zur Bestimmung der WHsAg-Konzentration wurde das Serum in die Stanzlöcher (\varnothing 5 mm) pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung (5 mA/Platte) läuft das Antigen in die Antikörper-haltige Agarose. Wo das Antigen und der Antikörper in äquivalenten Mengen vorliegen, bilden sich Präzipitationsbögen (blau). Die Länge der Bögen korreliert dabei mit der Antigenkonzentration. Mithilfe eines Standards kann diese dann quantifiziert werden. Der Maßstabsbalken (weiß) entspricht einer Länge von 10 mm.

Nach dem Färben der Laurell-Elektrophoreseplatten wurde die Höhe der Präzipitationsbögen ausgemessen. Dabei wurde vom Beginn der Antikörper-haltigen Agarose bis zur Spitze des Bogens gemessen. Für die Quantifizierung wurde aus der Höhe der Präzipitationsbögen des Standards und dessen bekannte Konzentration eine Standardgerade ermittelt, mit deren Formel die Antigenkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden konnte.

3.12 Enzym-Immunoassay (EIA) zur Detektion des HBsAg aus Zellkulturüberständen

Die Zellkulturüberstände der stabil transfizierten HeLa Zellen wurden zur Quantifizierung des SHBs im „Sandwich“-EIA eingesetzt. Dies wurde bereits in der Doktorarbeit von N. Kott ausführlich beschrieben und wird hier in eigenen Worten wiedergegeben [144].

Bei dem EIA bindet das nachzuweisende Antigen direkt an einen Primärantikörper, mit dem eine 96-Well Mikrotiter-Platte beschichtet ist. Durch einen Detektionsantikörper kann dann dieser Komplex nachgewiesen werden. Dieser Antikörper ist direkt mit einem Enzym gekoppelt, das die Umsetzung eines Substrats katalysiert. Der daraufhin entstehende Farbumschlag kann mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und mithilfe eines Standards die absolute Menge an Antigen quantifiziert werden.

Zunächst wurde eine 96-Well Mikrotiter-Platte mit 100 µl/Well des in Beschichtungspuffer 1:1000 verdünnten Antikörpers C20/02 bzw. HB1 beschichtet. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit dem Mikrotiter-Waschgerät zweimal mit 0,1 % Tween 20 in PBS und daraufhin zweimal mit PBS gewaschen. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Platte mit 200 µl/Well 10 % FKS in TNE für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte der Waschschrift, wie eben beschrieben. Daraufhin konnten die Proben auf die Platte aufgetragen werden. Dabei wurden 100 µl der unverdünnten Proben verwendet oder die Proben in 1 % Casein Lösung entsprechend verdünnt. Um eine absolute Quantifizierung vornehmen zu können, wurde ebenfalls eine Standardreihe mit definiertem HBsAg aus Serum eingesetzt. Die höchste Konzentration betrug dabei 10 ng/ml und wurde jeweils 1:2 verdünnt und anschließend auf die Platte aufgetragen. Nach einer Inkubation von 2 h auf dem Plattenrüttler bei RT wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen. Danach wurde das Anti-HBs-Biotin (aus dem Testkit Enzygnost HBsAg 6.0 von Siemens Healthcare) 1:40 in 0,1 % Casein/PBS verdünnt und jeweils 100 µl/Well auf die Platte aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 h auf dem Plattenschüttler bei RT wurde die Platte gewaschen und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (POD, 1 µg/ml) 1:500 in 0,1 % Casein/PBS verdünnt. Davon wurden jeweils 100 µl/Well auf die Platte pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder gewaschen und 100 µl/Well Substratlösung zugegeben. Für eine vollständige 96-Well Mikrotiter-Platte wurden für die Substratlösung 4 Orthophenyl-Diamin (OPD)-Tabletten (DAKO) in 12 ml H₂O aufgelöst und 5 µl Perhydrol zugegeben. Die Platte wurde dann für etwa 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bis ein Farbumschlag zu beobachten war. Die Reaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure (unter dem Abzug) gestoppt und die Extinktion des umgesetzten Substrats im EIA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Quantifizierung des HBsAg in den Proben erfolgte anschließend anhand der erstellten Standardgeraden.

3.13 Quantitative Bestimmung der HBsAg Konzentration im diagnostischen Test

Die HBsAg Konzentration wurde in der diagnostischen Abteilung der Medizinischen Virologie in Gießen im Immun-Assay-Automaten Architect von Abbott gemessen. Dies erfolgte mit dem quantitativen Test Kit von Abbott nach Herstellerangaben. Nachgewiesenermaßen können mit diesem Assay alle HBV-Genotypen gleich gut detektiert werden [18]. Die Proben wurden vor der Messung in humanem Negativ-Serum (BB102) vorverdünnt (1:100 – 1:10000).

4. Ergebnisse

4.1 Phänotypische Untersuchung von Therapie-resistenten Hepatitis-B-Virus Mutanten

Für die Untersuchung und den Nachweis von verschiedenen Resistenzmustern wurden unterschiedliche HBV-Klone phänotypisch untersucht. Dazu wurde ein bereits etablierter Assay genutzt [131], wie unter 3.10 beschrieben. Zunächst soll hier die Wirksamkeit des Testsystems anhand des HBV-Wildtyps und eines bekannten Therapie-resistenten Klons aufgezeigt werden. Anschließend wurde ein multiresistenter HBV-Klons untersucht, der nachweislich eine hohe Resistenz gegenüber mehreren antiviralen Nukleos(t)id-Analoga zeigt [130].

4.1.1 Bestimmung der Resistenzprofile eines HBV Wildtyps und eines definierten Therapie-resistenten Klons

Um Resistenzen bezüglich Adefovir und Tenofovir mit dem phänotypischen Assay evaluieren zu können, sollten zunächst die Negativkontrolle in Form des HBV-Wildtyps sowie der HBV-Klon Muc38 als typische Resistenzvariante mit hoher Adefovir- bzw. Tenofovir-Resistenz verifiziert werden. Ein typisches Resistenzmuster, das häufig in Patienten gefunden wird, beinhaltet die gut charakterisierten Primärmutationen rtA181V und rtN236T im Bereich der Reversen Transkriptase (rt) der HBV-Polymerase. Diese Mutationen liegen in dem Klon Muc38 vor, welcher ansonsten dem Wildtyp entspricht. Um die Resistenzprofile der einzelnen Klone später vergleichen zu können, wurde bei jedem Versuchsansatz ein Wildtyp (pCH9/3091) mitgeführt. Aus diesen Ansätzen wurde für jedes NA ein Wildtyp-Konsensus ermittelt. Die resultierende Inhibitionskurve ist in Abbildung 11 dargestellt. Für die hier verwendeten HepG2-Zellen beträgt die IC_{50} für Adefovir 218,1 nM, für Entecavir 0,3 nM, für Lamivudin 9,9 nM und für Tenofovir 388,7 nM. Der Resistenzfaktor (RF) errechnet sich aus dem Quotienten der IC_{50} des Wildtyps und der IC_{50} des jeweiligen Klons bei dem entsprechenden NA und beschreibt den Faktor, um den die IC_{50} erhöht ist. Im Vergleich zum Wildtyp ist die IC_{50} des Klons Muc38 bei Adefovir etwa 7-mal höher. Auch bei Lamivudin und Tenofovir ist ein erhöhter RF von 4,8 bzw. 3,5 zu sehen. Aufgrund der durchgeführten ANOVA lässt sich auch eindeutig feststellen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Wildtypkurve und der Kurve des HBV-Klons Muc38 vorliegt. Bei den Kurven des Wildtyps und des Klons Muc38 nach der Inhibition mit Entecavir liegt jedoch kein signifikanter Unterschied vor.

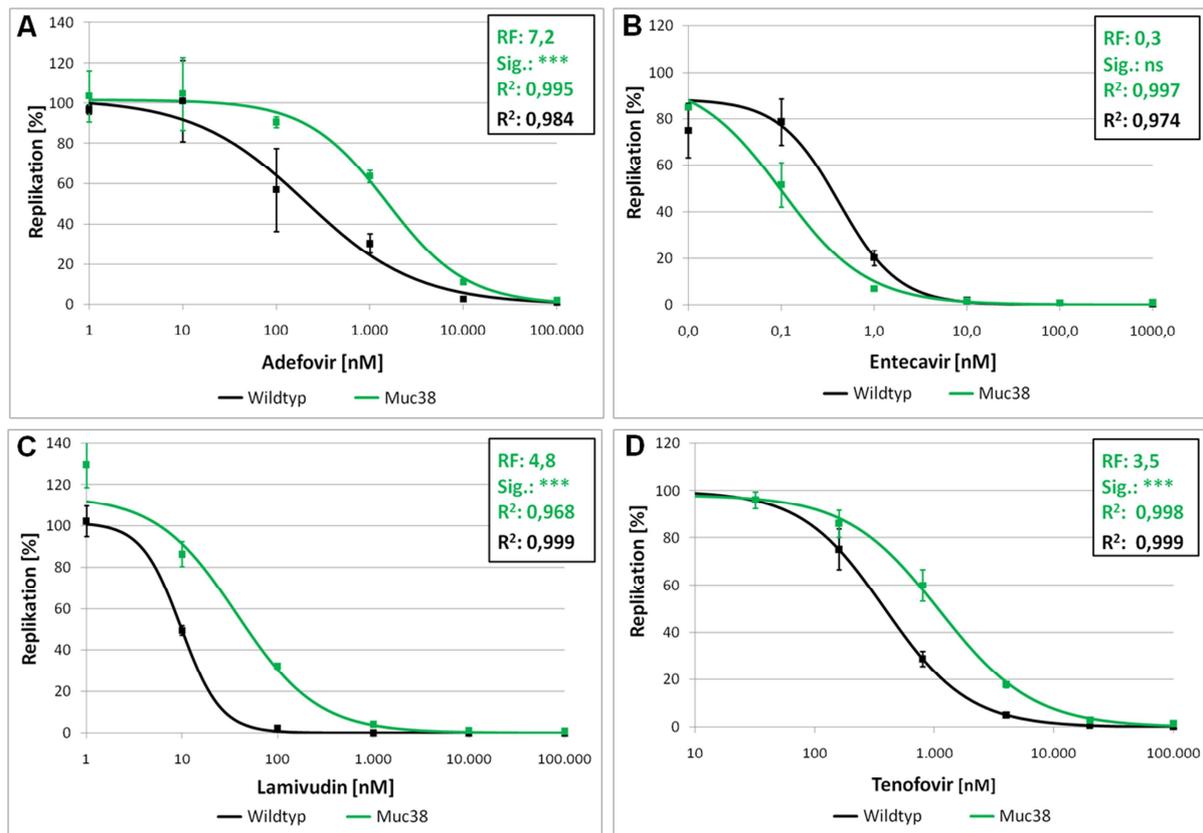


Abbildung 11: Vergleich der Resistenzprofile des HBV Wildtyps (pCH9-3091, schwarz) mit einer resistenten HBV-Variante mit den Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T (Muc38, grün). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) und die Signifikanz (Sig.) beziehen sich jeweils auf den Wildtyp und sind zusammen mit dem Bestimmtheitsmaß (R²) in der Box oben rechts angegeben. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 5,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 1,0 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1,1 \times 10^{-4}$. **A:** Inhibition mit Adefovir; **B:** Inhibition mit Entecavir; **C:** Inhibition mit Lamivudin; **D:** Inhibition mit Tenofovir.

4.1.2 Phänotypische Analyse des multiresistenten HBV-Klons 150-1 mittels Domänaustausch im Gen der HBV-Polymerase

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Mutante 150-1 außergewöhnlich hohe Resistenzen gegen die 4 klinisch relevanten NAs Adefovir, Entecavir, Lamivudin und Tenofovir aufweist, die mit den bisher bekannten Resistenzmutationen nicht vollständig zu erklären sind. Insgesamt zeigte der Klon 150-1 bereits in früheren Arbeiten eine deutlich erhöhte Adefovir-, Entecavir- und Tenofovir-Resistenz, sowie eine moderate Resistenz gegenüber Lamivudin [131], [130].

Bei dem Patienten, aus dem der HBV-Klon 150-1 isoliert wurde, handelt es sich um einen chronischen mono-infizierten Hepatitis-B-Patienten (d.h. ohne andere Hepatitisvirus- oder HIV-Infektion), der eine antivirale Therapie mit NA erhalten hatte. In der Vergangenheit wurde der Patient zunächst für 39 Monate mit Lamivudin und anschließend für 20 Monate

mit Adefovir behandelt, auf die für 40 Monate eine Behandlung mit Tenofovir folgte (persönliche Mitteilung Dr. Florian van Bömmel, Sektion Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig). Die Gabe des NA Tenofovir führte zunächst zu einem Abfall der Viruslast, nach etwa 30 Monaten kam es jedoch wieder zu einem Anstieg der Viruskonzentration im Blut (Abbildung 12). Zudem wurde während des Verlaufs der HBV-Infektion zu bestimmten Zeitpunkten die HBsAg-Konzentration im Blut gemessen. Dabei wurde deutlich, dass die HBsAg-Konzentration bis etwa 10 Monate nach Start der Tenofovirgabe anstieg und im späteren Verlauf der Therapie wieder absank.

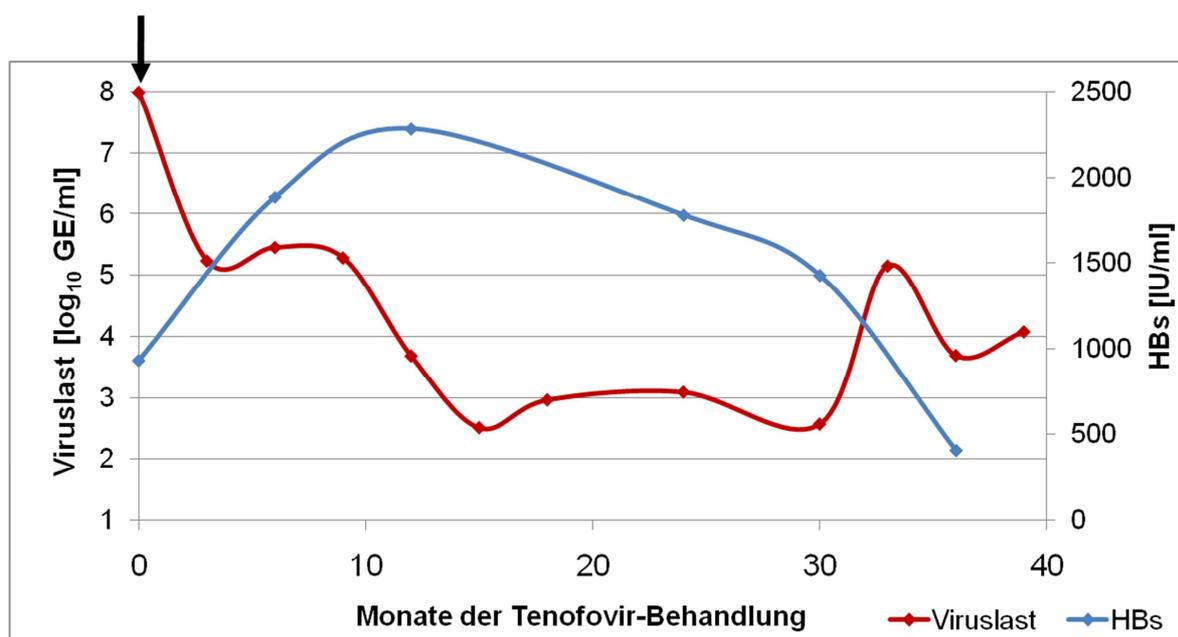


Abbildung 12: Verlauf der Viruslast und der HBsAg-Konzentration während der Behandlung mit Tenofovir des Patienten FvB 150. Der schwarze Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Blutabnahme an, aus welchem dann der Klon 150-1 isoliert wurde. Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. van Bömmel Sektion Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig, Deutschland.

Der hier untersuchte Klon 150-1 wurde aus dem Blut des Patienten nach dem virologischen Durchbruch (*virological breakthrough*) unter Adefovir-Therapie und vor der Gabe von Tenofovir isoliert. Anschließend wurde das Polymerase-Gen in das Plasmid pCH9-3091 einkloniert. Der Klon weist im Vergleich zu dem hier verwendeten HBV-Wildtyp pCH9/3091 im Polymerase-Gen sehr viele Mutationen auf. Die einzigen bekannten Resistenzmutationen die der Klon aufweist, sind jedoch die Mutationen rtA181V und rtN236T, die aber nicht allein für die hohe Resistenz gegen alle untersuchten NAs verantwortlich sein können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass, anders als bisher angenommen, eine oder mehrere

Resistenzmutationen außerhalb der RT-Domäne für das außergewöhnliche Resistenzprofil mitverantwortlich sind [130]. Für die genaue Ermittlung der verantwortlichen Resistenzmutation(en) wurden verschiedene Varianten der HBV-Polymerase innerhalb eines 1.1 HBV Expressionsplasmids durch Klonierung und gerichtete Mutagenese hergestellt und phänotypisch untersucht (Abbildung 13). Dabei wurde zu Vergleichszwecken neben den Basis-HBV-Varianten und Kontrollen (Abbildung 13 Nr. 1, 2 und 3) auch eine weitere Mutante (Abbildung 13 Nr. 13) nochmals evaluiert, die bereits während meiner Masterarbeit kloniert und phänotypisch analysiert wurde.

Für eine erste Eingrenzung des Bereichs der HBV-Polymerase, in welchem die verantwortliche Resistenz vorliegen könnte, wurden die Klone zunächst in Huh7-Zellen transfiziert und phänotypisch untersucht. Es wurden hierbei nur die Auswirkungen auf das NA Tenofovir betrachtet, da dieses momentan die größte klinische Relevanz hat.

Wie erwartet zeigte der Klon 150-1 (Abbildung 13 Nr. 1) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 13 Nr. 2) einen RF von 20 auf, wohingegen der RF des Klons Muc38 (Abbildung 13 Nr. 3) mit den bekannten Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T, nur etwa 3 beträgt. Sowohl der Wildtyp, als auch der Klon Muc38 zeigten signifikante Unterschiede zu dem Klon 150-1 (Abbildung 14).

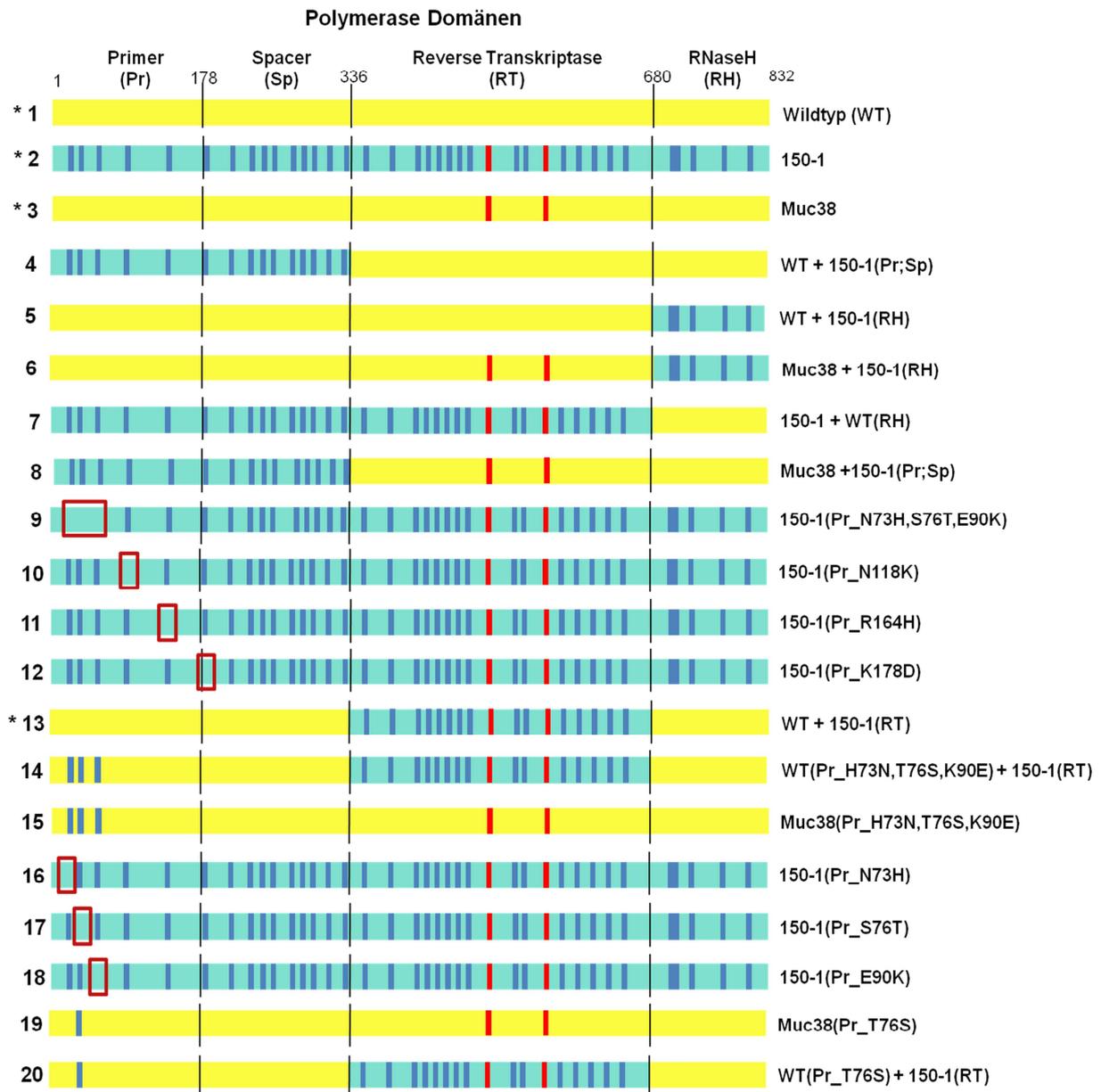


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Polymerase der getesteten Klone. Die gelben Bereiche stellen die Polymerase bzw. die verschiedenen Domänen eines HBV-Wildtyps (pCH9-3091) dar. Die hellblauen Abschnitte kennzeichnen die Polymerase des Klons 150-1, bzw. deren ausgetauschte Domänen. Die roten Balken stehen für die bekannten Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T, die dunkelblauen Balken stellen die übrigen Mutationen des Klons 150-1 im Unterschied zum Wildtyp dar. Mit dunkelrotem Kasten sind zur besseren Erkennung die durch gerichtete Mutagenese entfernten Mutationen gekennzeichnet. Die mit * markierten Konstrukte wurden bereits in der Masterthesis [130] generiert und in dieser Arbeit nochmals evaluiert.

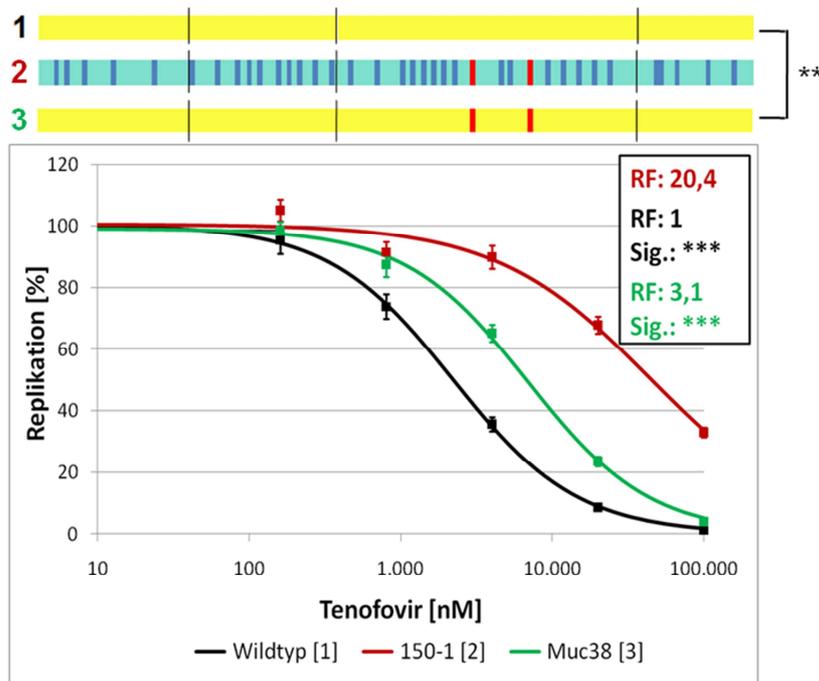


Abbildung 14: Vergleich der Resistenzprofile eines HBV-Wildtyps (pCH9-3091, schwarz) mit den resistenten HBV-Varianten Muc38 (A181V und N236T, grün) und 150-1 (zu untersuchender Klon, rot). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitorenkurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Damit wurde nochmals deutlich, dass innerhalb der HBV-Polymerase der Variante 150-1 (Abbildung 13 Nr.2) eine einzelne Mutation oder eine Kombination aus verschiedenen Mutationen (Abbildung 13 Nr.2, dunkelblaue Balken) zusätzlich oder unabhängig von den bereits bekannten Mutationen (rote Balken) der HBV-Variante Muc38 (Abbildung 13 Nr. 3) vorliegt.

Zur Eingrenzung der verantwortlichen Mutationen wurden zunächst gesamte Domänenaustausche der Polymerase zwischen dem Klon 150-1 und dem Klon Muc38 bzw. dem Wildtyp durchgeführt (Abbildung 13 Nr. 4-8 und 13).

Zuerst wurde der Austausch der Primer/Spacer-Domäne (WT + 150-1(Pr;Sp); Abbildung 13 Nr. 4) und der RNaseH-Domäne (WT + 150-1(RH); Abbildung 13 Nr. 5) des Klons 150-1 in den HBV-Wildtyp pCH9-3091 durchgeführt. Die beiden Klone zeigen in diesem Assay keinen verstärkenden Einfluss auf die Tenofovir-Resistenz des Klons Muc38 (Abbildung 15). Beide Klone wiesen keinen Unterschied zum Wildtyp auf und sind signifikant unterschiedlich zu dem Klon 150-1.

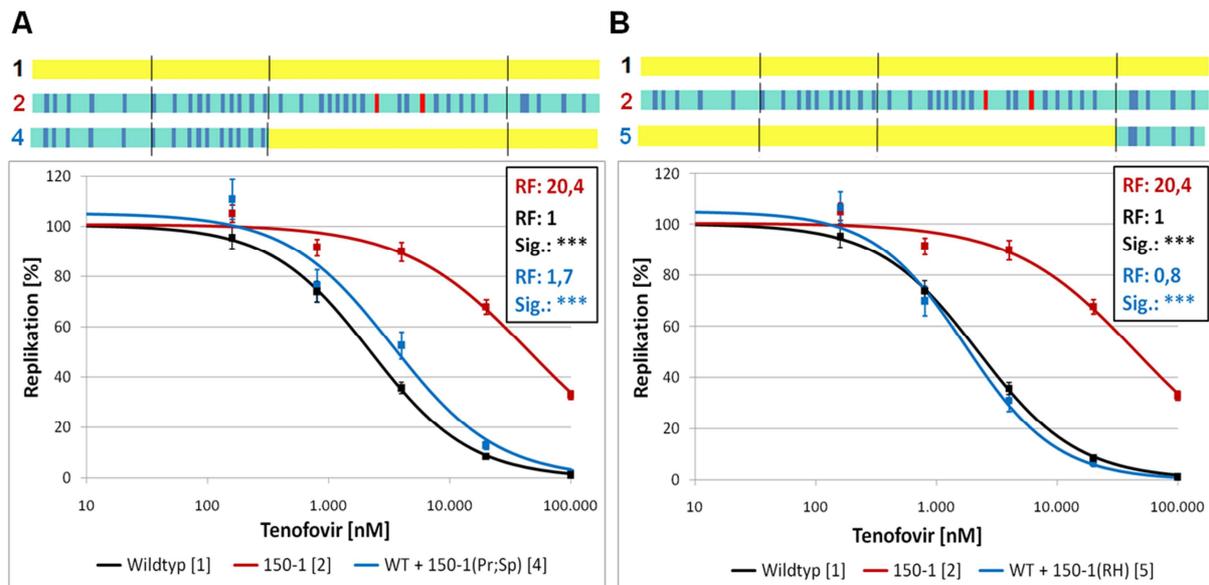


Abbildung 15: Die Mutationen rtA181V und rtN236T sind entscheidend für die Resistenzentwicklung des Klons 150-1. A: Vergleich des HBV-Wildtyps pCH9-3091 (schwarz), des Klons 150-1 (rot) und des Klons WT + 150-1(Pr;Sp) (blau). **B:** Darstellung der Kurven des HBV-Wildtyps pCH9-3091 (schwarz), des Klons 150-1 (rot) sowie des Klons WT + 150-1(RH) (blau). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Für die Fragestellung, ob eine Mutation in der RNaseH-Domäne für die hohe Resistenz gegen Tenofovir verantwortlich ist, wurden die Klone 150-1 + WT(RH) (Abbildung 13 Nr. 7) und Muc38 + 150-1(RH) (Abbildung 13 Nr. 6) phänotypisch untersucht. Der Austausch der RNaseH-Domäne des Klons 150-1 mit der des Wildtyps (Klon 150-1 + WT(RH)) bewirkt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kurven in Bezug auf die Tenofovir-Resistenz (Abbildung 16 A). Fügt man im Umkehrschluss die RNaseH-Domäne des Klons 150-1 in den Klon Muc38 ein (Klon Muc38 + 150-1(RH)), ist auch hier bezüglich der Tenofovir-Resistenz kein Unterschied zu dem Klon Muc38 zu erkennen und beide Kurven liegen signifikant entfernt zu der des Klons 150-1 (Abbildung 16 B). Somit kann gezeigt werden, dass die Mutationen in der RNaseH-Domäne keinen Einfluss auf die erhöhte Tenofovir-Resistenz des Klons 150-1 haben.

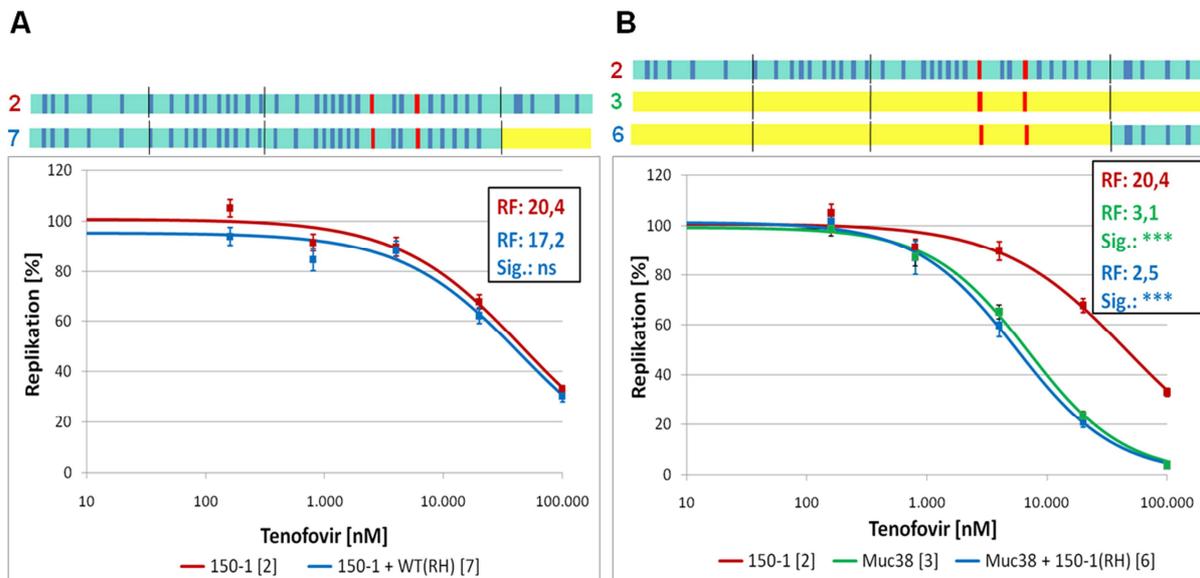


Abbildung 16: Mutationen in der RNaseH-Domäne des Klons 150-1 haben keinen Einfluss auf die Resistenzbildung. **A:** Vergleich der Klone 150-1 (rot) und 150-1 + WT(RH) (blau). **B:** Darstellung der Kurven des Klons 150-1 (rot), des Klons Muc38 (grün) sowie des Klons Muc38 + 150-1(RH) (blau). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Fügt man die Primer- und Spacer-Domäne des Klons 150-1 in die Polymerase des Klons Muc38 (Klon Muc38 + 150-1(Pr;Sp); Abbildung 13 Nr. 8) ein, kann man im Vergleich zu der IC_{50} des Muc38 eine 3-fach höhere Resistenz für die Chimäre nachweisen (Abbildung 17). Der RF des Klons 150-1 war noch zweifach höher, als die Chimäre Nr. 8. Der Unterschied zwischen der Chimäre und dem Klon 150-1 ist jedoch nicht mehr signifikant. Damit lässt sich vermuten, dass außerhalb der RT-Domäne eine oder mehrere Mutation(en) im Bereich der Primer- und Spacer-Domäne für die erhöhte Resistenz des Klons 150-1 verantwortlich sein könnte(n). Innerhalb der RT-Domäne könnten noch weitere Mutationen relevant sein, da die Resistenz des Klons 150-1 durch die Chimäre Nr. 8 nicht vollständig erreicht wird.

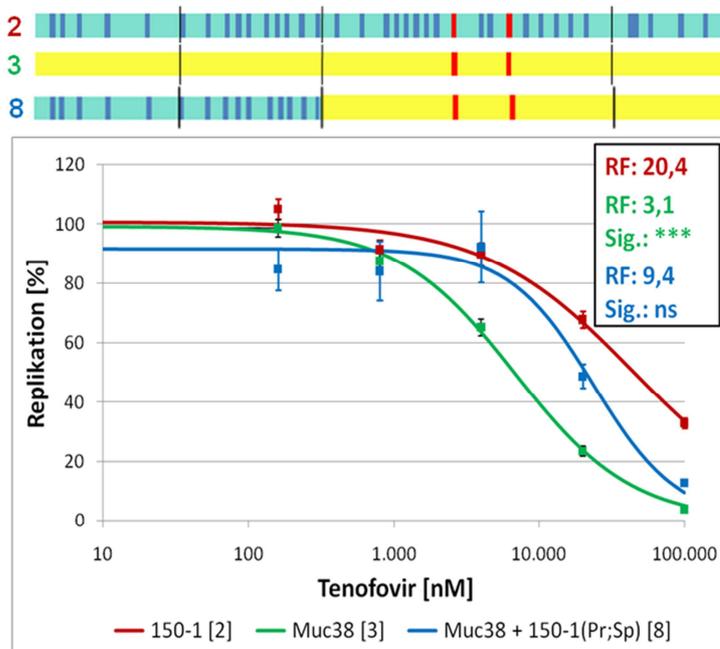


Abbildung 17: Resistenzprofile der resistenten HBV-Varianten Muc38 mit den Resistenzmutationen rtA181V und rtN236T (grün), 150-1 (rot) und Muc38 + 150-1(Pr;Sp) (blau). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über dem Graph ist die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

4.1.3 Phänotypische Analyse des multiresistenten HBV-Klons 150-1 mittels Aminosäurenaustausch

Um die genaue(n) Mutation(en) zu ermitteln, die in der Primer-/Spacer-Domäne für die hohe Resistenz außerhalb der RT-Domäne sorgt, wurden die einzelnen Mutationen aus dem Klon 150-1 mittels gerichteter Mutagenese zur jeweiligen Wildtyp-Aminosäure mutiert. Der Klon 150-1 weist im Unterschied zum Wildtyp 5 Mutationen in der Primer- und 10 Mutationen in der Spacer-Domäne auf. Da die Spacer-Domäne sehr variabel ist und es dadurch nicht sehr wahrscheinlich erschien, dass in diesem Abschnitt die verantwortliche Resistenz zu finden war, wurden nur die Mutationen der Primer-Domäne in Betracht gezogen und mittels gerichteter Mutagenese mutiert. Da die erste Aminosäure der Spacer-Domäne auch mutiert war, wurde diese wegen der Nähe zur Primer-Domäne mit untersucht. Aufgrund der räumlichen Nähe zueinander wurden die Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 in der Primer-Domäne über die gerichtete Mutagenese mittels In-Fusion HD in einem Schritt mutiert (Abbildung 13 Nr. 9-12). Betrachtet man die Klone 150-1(Pr_N118K), 150-1(Pr_R164H) und 150-1(Pr_K178D) so lässt sich bei keinem der 3 Klone ein Unterschied zu dem Klon 150-1 feststellen (Abbildung 18 B). Die Inhibitionskurve des Klons

150-1(Pr_N73H,S76T,E90K) verläuft jedoch signifikant niedriger, als die des Klons 150-1 (Abbildung 18 A). Der RF des mutierten Klons ist etwa 3-mal geringer, als der des Klons 150-1. Damit scheinen eine oder mehrere Austausche an den Stellen 73, 76 oder 90 für die hohe Resistenz dieses Klons verantwortlich zu sein.

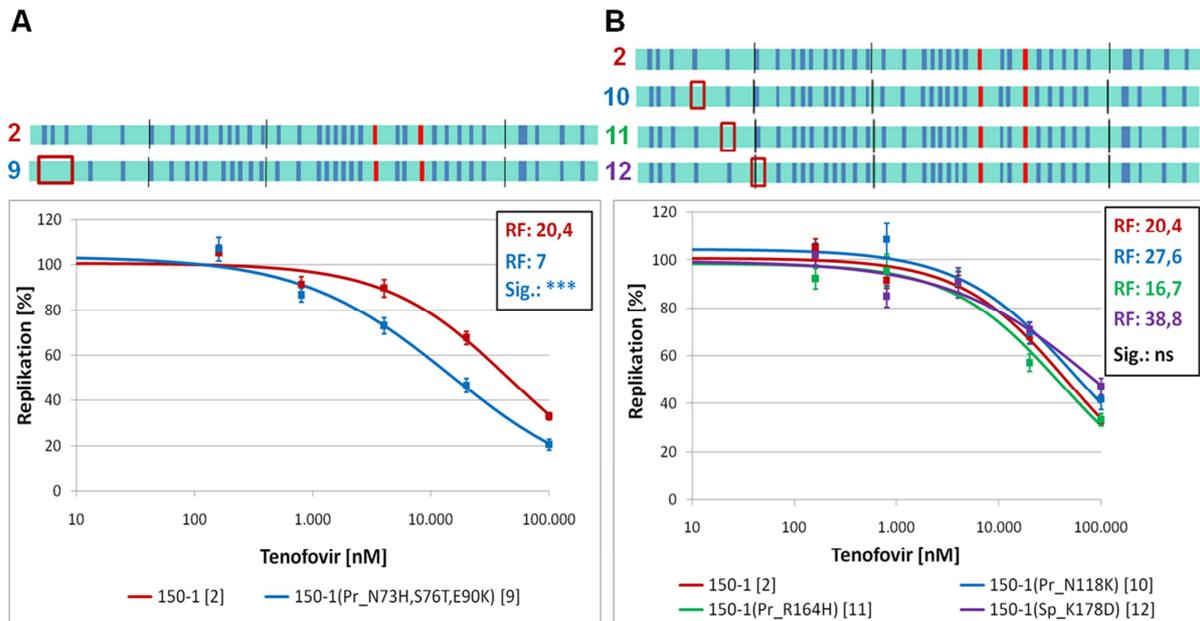


Abbildung 18: Eine oder mehrere der Mutationen prH73N, prT76S und prK90E in der Primer-Domäne ist bzw. sind verantwortlich für die hohe Resistenz des HBV-Klons 150-1 **A:** Vergleich der Klone 150-1 (rot) und 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K) (blau). **B:** Abgebildet sind die Resistenzprofile des Klons 150-1 (rot) sowie der Klone 150-1(Pr_N118K) (blau), 150-1(Pr_R164H) (grün) und 150-1(Pr_K178D) (lila). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Im Umkehrschluss wurden die Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 (Klon Muc38(Pr_H73N,T76S,K90E); Abbildung 13 Nr. 15) mithilfe der gerichteten Mutagenese in den Klon Muc38 eingefügt. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven des Klons Muc38 mit und ohne Mutationen zu erkennen (Abbildung 19 A). Wurden die Mutationen eingefügt, ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven des Klons 150-1 und des Klons Muc38(Pr_H73N,T76S,K90E) zu sehen. Ein ähnliches Ergebnis war auch bei dem Vergleich der beiden Klone WT + 150-1(RT) (Abbildung 13 Nr. 13) und WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT) (Abbildung 13 Nr. 14, Abbildung 19 B) zu beobachten. Mit den Mutationen kann kein signifikanter Unterschied zu dem Klon 150-1 festgestellt werden, wohingegen ein signifikanter Unterschied zu dem Klon WT + 150-1(RT)

ohne die 3 Mutationen besteht. Umgekehrt ist es also möglich, eine Erhöhung der Resistenz zu erwirken, wenn man zusätzlich zu den Mutationen rtA181V und rtN236T des Klons Muc38 die 3 Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 in die Primer-Domäne einfügt. Der Klon WT + 150-1(RT) wurde bereits zusammen mit dem HBV-Wildtyp pCH9-3091 und dem Klon 150-1 in meiner Masterarbeit getestet [130]. Um das vorangegangene Ergebnis zu evaluieren, wurden die Klone in dieser Arbeit mit weiteren Replikaten erneut phänotypisch untersucht. Zudem wurde eine neue Charge der NAs eingesetzt, wodurch es nötig wurde, diese Klone erneut zu testen. Die erneute Messung der Klone diente dann für den Vergleich der Resistenzprofile.

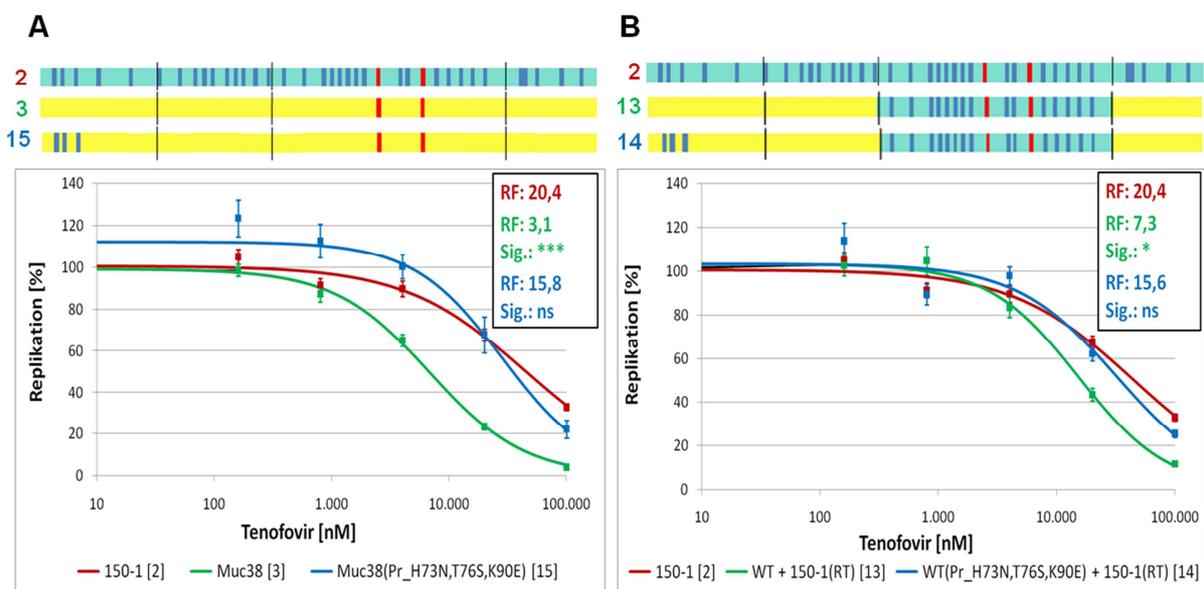


Abbildung 19: Einfluss der Mutationen prH73N, prT76S und prK90E auf die Resistenz. **A:** Vergleich der HBV-Klone 150-1 (rot), Muc38 (grün) und Muc38(Pr_H73N,T76S,K90E) (blau). **B:** Darstellung der Resistenzprofile der Klone 150-1 (rot), WT + 150-1(RT) (grün) und WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT) (blau). Der Versuch wurde mit Huh7-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitorskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Mit der Untersuchung der verschiedenen Klone konnte in Huh7-Zellen somit bestätigt werden, dass für die Resistenzbildung des HBV-Klons 150-1 die Primärmutationen rtA181V und rtN236T benötigt werden. Zudem konnte die Lage der sekundären Resistenzmutation auf die Primer- und Spacer-Domäne und in nachfolgenden Analysen auf die Mutationen prH73N, prT76S und prK90E in der Primer-Domäne der HBV-Polymerase eingegrenzt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung der Resistenzprofile, der in Huh7 phänotypisch untersuchten HBV-Klone. Dargestellt sind der Wildtyp, das Patientenisolat 150-1 und verschiedene Klone, die mit Tenofovir inhibiert wurden. Der Resistenzfaktor (RF₅₀) bezieht sich auf den Wildtyp, wohingegen die Signifikanz (Sig.) im Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet wurde: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. Das Bestimmtheitsmaß (R²) der Kurven ist in der rechten Spalte angegeben. grün: keine Resistenz im Vergleich zum Wildtyp; gelb: leicht erhöhte Resistenz (RF 2 bis 10); rot: deutlich erhöhte Resistenz (RF > 10).

	Mutante	RF ₅₀	Sig.	R ²
[1]	Wildtyp	1	***	1
[2]	150-1	20,4		0,98
[3]	Muc38	3,1	***	1
[4]	WT +150-1(Pr;Sp)	1,7	***	0,98
[5]	WT + 150-1(RH)	0,8	***	0,99
[6]	Muc38 + 150-1(RH)	2,5	***	1
[7]	150-1 + WT(RH)	17,2	ns	0,97
[8]	Muc38 +150-1(Pr;Sp)	9,4	ns	0,96
[9]	150-1(Pr_N73H,S76T,E90K)	7	***	0,98
[10]	150-1(Pr_N118K)	27,6	ns	0,97
[11]	150-1(Pr_R164H)	16,7	ns	0,98
[12]	150-1(Pr_K178D)	38,8	ns	0,94
[13]	WT + 150-1(RT)	7,3	*	0,99
[14]	WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT)	15,6	ns	0,94
[15]	Muc38(Pr_H73N,T76S,K90E)	15,8	ns	0,96

Um zu zeigen, dass es sich bei der hohen Resistenz des Klons 150-1 in humanen Hepatomzellen (Huh7) nicht um ein Artefakt der Zelllinie Huh7 handelte, wurden die Klone teilweise mit einer weiteren Zelllinie getestet. Dabei wurden für die weiteren Versuche HepG2-Zellen verwendet. HepG2-Zellen gelten als differenzierter und sensitiver gegenüber den NA und sind damit den hochdifferenzierten humanen Hepatozyten ähnlicher als Huh7-Zellen [139]. Daher wurde diese Zelllinie eingesetzt, um die bereits getätigten AS-Austausche zu untersuchen. Hier wurde als Kontrolle in den meisten Fällen zusätzlich zur Resistenztestung gegen Tenofovir auch das Resistenzverhalten auf Adefovir untersucht, da beide NA aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit und dem Wirkmechanismus ein vergleichbares Resistenzmuster zeigen sollten (Abbildung 5). Zudem wurde deutlich, dass der Resistenzfaktor des Klons 150-1 bei dem Wirkstoff Tenofovir um 20 lag. Die RF-Werte bei Adefovir lagen weit darüber [130] und eröffneten eine exaktere Berechnung einzelner HBV-Varianten.

Auch bei HepG2-Zellen kann man deutlich erkennen, dass bei dem HBV-Klon 150-1 sowohl die Resistenz gegen Adefovir, als auch gegen Tenofovir im Vergleich zu dem HBV-Wildtyp pCH9/3091 und dem Klon Muc38 stark erhöht ist (Abbildung 20). Der Resistenzfaktor bei Adefovir ist bei dem Klon 150-1 und dem Klon Muc38 deutlich höher als bei der Behandlung mit Tenofovir. Insgesamt sind die IC_{50} -Werte jedoch niedriger, als bei den Huh7-Zellen.

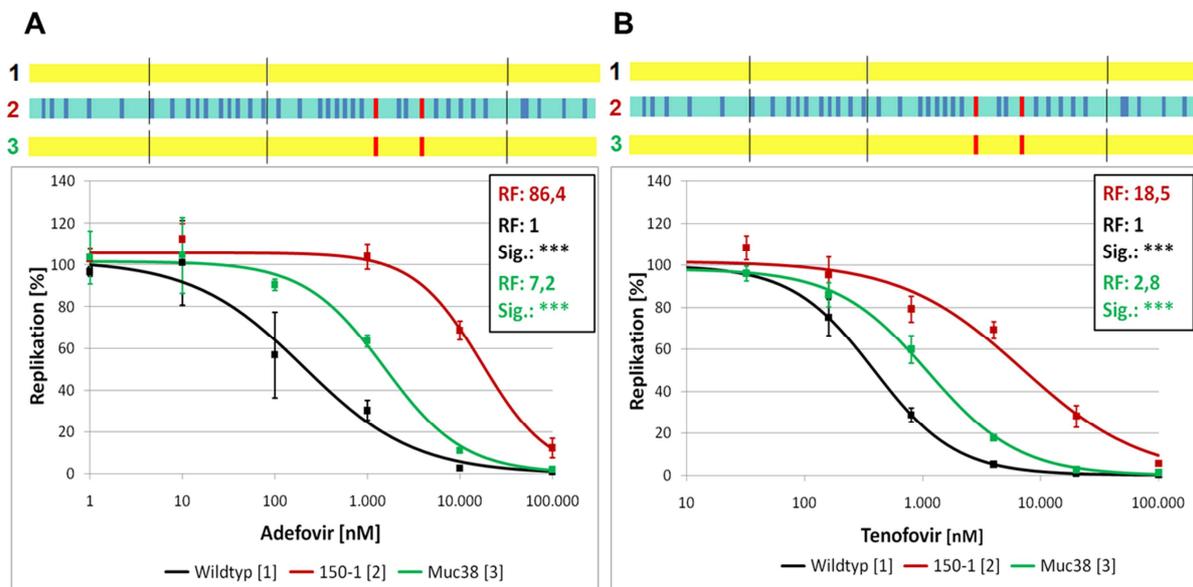


Abbildung 20: Vergleich der Resistenzprofile eines HBV-Wildtyps (pCH9-3091, schwarz) mit den resistenten HBV-Varianten (A181V und N236T, grün) und 150-1 (rot). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. **A:** Die Inhibition erfolgte mit Adefovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. **B:** Die Inhibition erfolgte mit Tenofovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Führt man eine phänotypische Untersuchung mit den Klonen 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K) (Abbildung 13 Nr. 9) und WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT) (Abbildung 13 Nr. 14) mit HepG2-Zellen durch, kann man deutlich sehen, dass der Zelltyp keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten hat. Auch hier ist erkennbar, dass der Klon 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K) ohne die Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 signifikant weniger resistent ist, als der Klon 150-1 (Abbildung 21 A). Dagegen wird ein mit dem Klon 150-1 vergleichbarer RF erreicht, wenn man zu dem Klon WT + 150-1(RT) die Mutationen prH73N, prT76S und prK90E in der Primer-Domäne hinzufügt (Abbildung 21 B). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine der drei Mutationen für die starke Resistenz des Klons 150-1 verantwortlich ist.

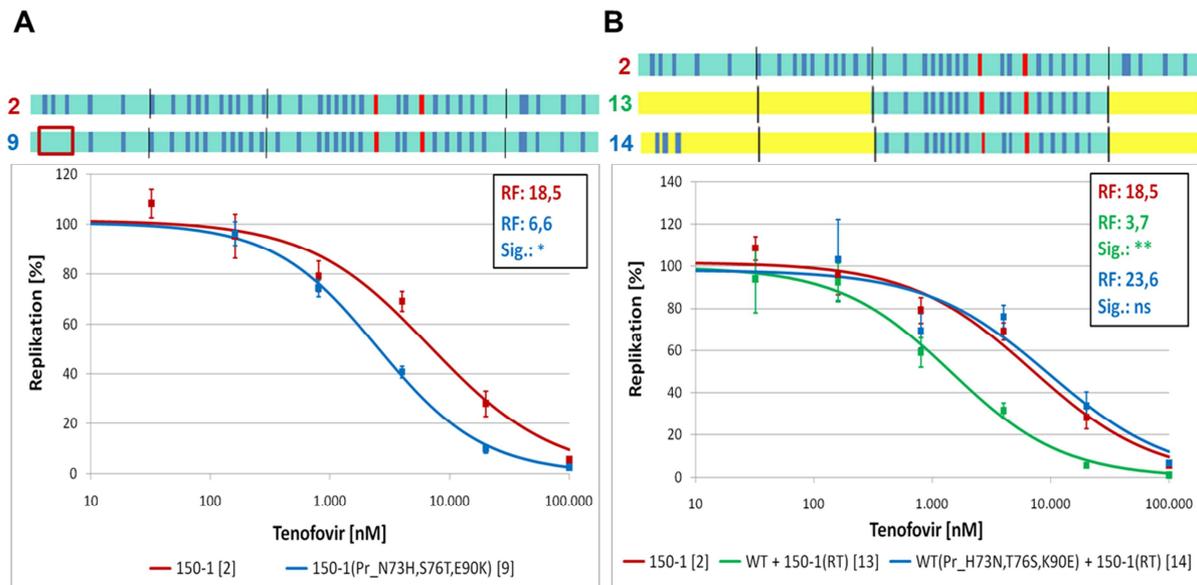


Abbildung 21: Einfluss der Mutationen innerhalb der Primer-Domäne (prH73N, prT76S und prK90E) auf die Resistenz gegenüber Tenofovir. **A:** Vergleich der Klone 150-1 (rot) und 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K) (blau). **B:** Abgebildet sind die Resistenzprofile des Klons 150-1 (rot) sowie der Klone WT + 150-1(RT) (grün) und WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT) (blau). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Um die einzelne Mutation zu identifizieren, die für die hohe Resistenz des HBV-Klons 150-1 verantwortlich ist, wurden die Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 mittels gerichteter Mutagenese jeweils einzeln aus dem Klon 150-1 zu den entsprechenden Aminosäuren im Wildtyp mutiert (Abbildung 13 Nr. 16-18). Nach der phänotypischen Untersuchung konnte man sowohl bei der Inhibition mit Adefovir, als auch bei Tenofovir erkennen, dass die Klone 150-1(Pr_N73H) und 150-1(Pr_E90K) keinen signifikanten Unterschied zu dem Klon 150-1 aufweisen (Abbildung 22). Diese Mutationen scheinen somit nicht für die Resistenzbildung des Klons 150-1 verantwortlich zu sein. Betrachtet man dagegen die Resistenzprofile des Klons 150-1(Pr_S76T) nach der Inhibition mit Adefovir und Tenofovir lässt sich ein signifikanter Unterschied zu dem Klon 150-1 feststellen (Abbildung 23). Der RF ist 8- bzw. 5-mal geringer als die des Klons 150-1. Die Rückmutation an der Stelle 76 führt anscheinend zu einer deutlichen Verringerung der Resistenz.

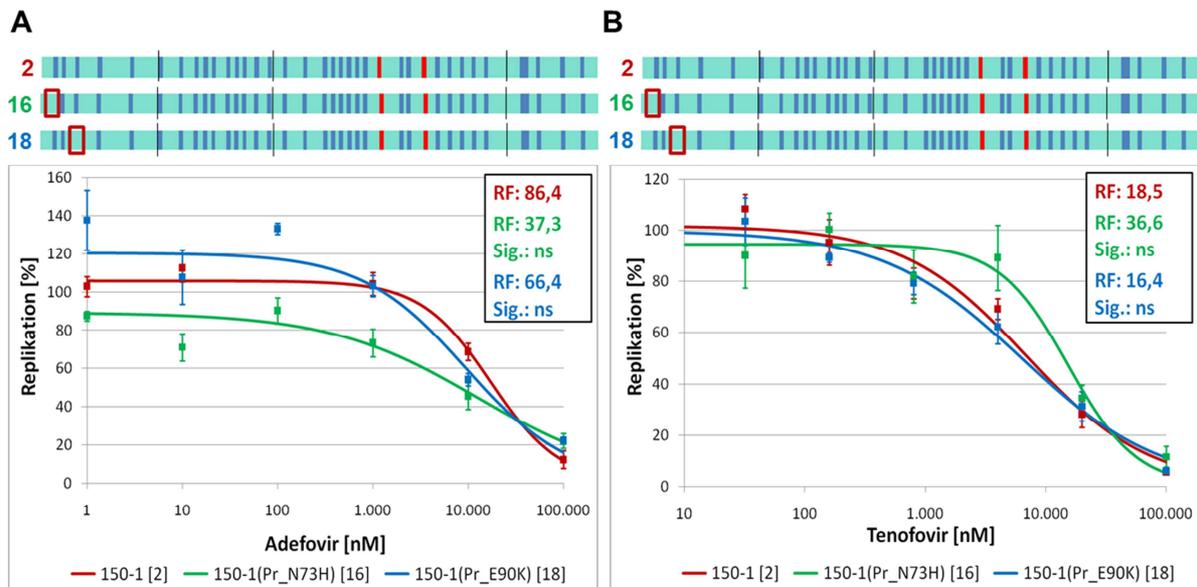


Abbildung 22: Einfluss der Mutationen prH73N und prK90E innerhalb der Primer-Domäne der HBV-Polymerase auf die antivirale Resistenz. Gezeigt sind die Resistenzprofile der Klone 150-1 (rot), 150-1(Pr_N73H) (grün) und 150-1(Pr_E90K) (blau). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitorskurven. **A:** Die Inhibition erfolgte mit Adefovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. **B:** Die Inhibition erfolgte mit Tenofovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

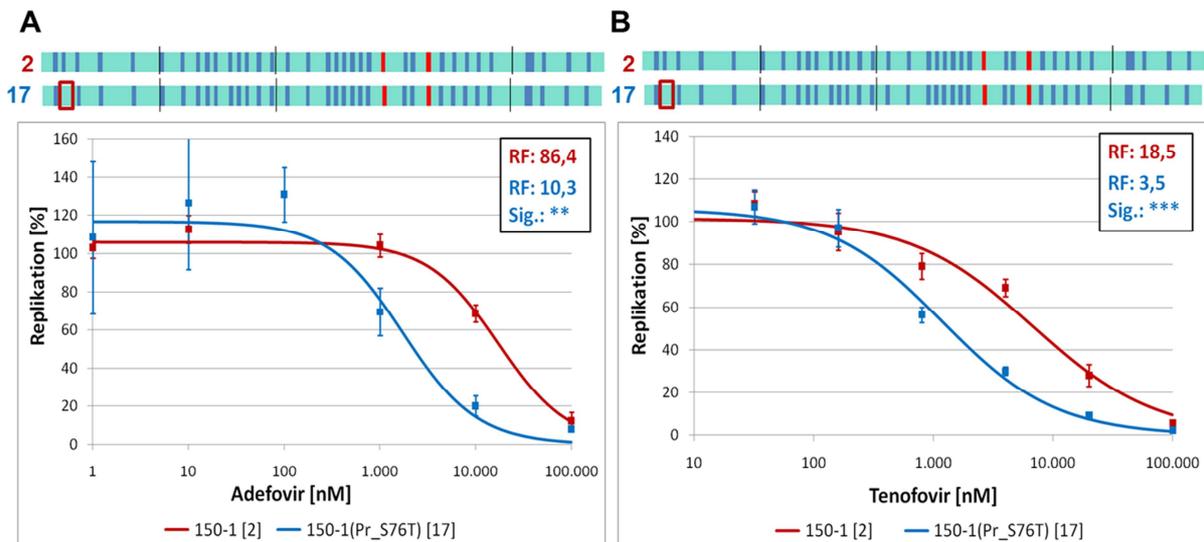


Abbildung 23: Einfluss der Mutation prT76S innerhalb der Primer-Domäne der HBV-Polymerase auf die Resistenz gegenüber den Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir. Gezeigt sind die Resistenzprofile der Klone 150-1 (rot) und 150-1(Pr_S76T) (blau). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitorenkurven. **A:** Die Inhibition erfolgte mit Adefovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. **B:** Die Inhibition erfolgte mit Tenofovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Um zu untersuchen, ob die Insertion der Mutation prT76S innerhalb der Primer-Domäne zu einer Erhöhung der antiviralen Resistenz gegen Nukleotidanaloga führt, wurde diese mittels gerichteter Mutagenese in die HBV-Klone eingefügt, die bereits über die zwei Primärmutationen rtA181V und rtN236T im RT-Bereich verfügen (Muc38 sowie WT + 150-1(RT)). Die so entstandenen Klone Muc38(Pr_T76S) (Abbildung 13 Nr. 19) und WT(Pr_T76S) + 150-1(RT) (Abbildung 13 Nr. 20) wurden dann phänotypisch gegenüber Adefovir und Tenofovir untersucht. Bei der Inhibition mit Adefovir ist bei dem Klon Muc38(Pr_T76S) eine deutliche Erhöhung des RFs um den Faktor 5 im Vergleich zu dem Klon Muc38 zu erkennen (Abbildung 24 A). Auch bei dem Ansatz mit Tenofovir ist dieser Anstieg des RFs im Vergleich zu dem Klon Muc38 zu erkennen (Abbildung 24 B). Bei beiden Kurven ist kein signifikanter Unterschied mehr zu dem Profil des Klons 150-1 zu erkennen.

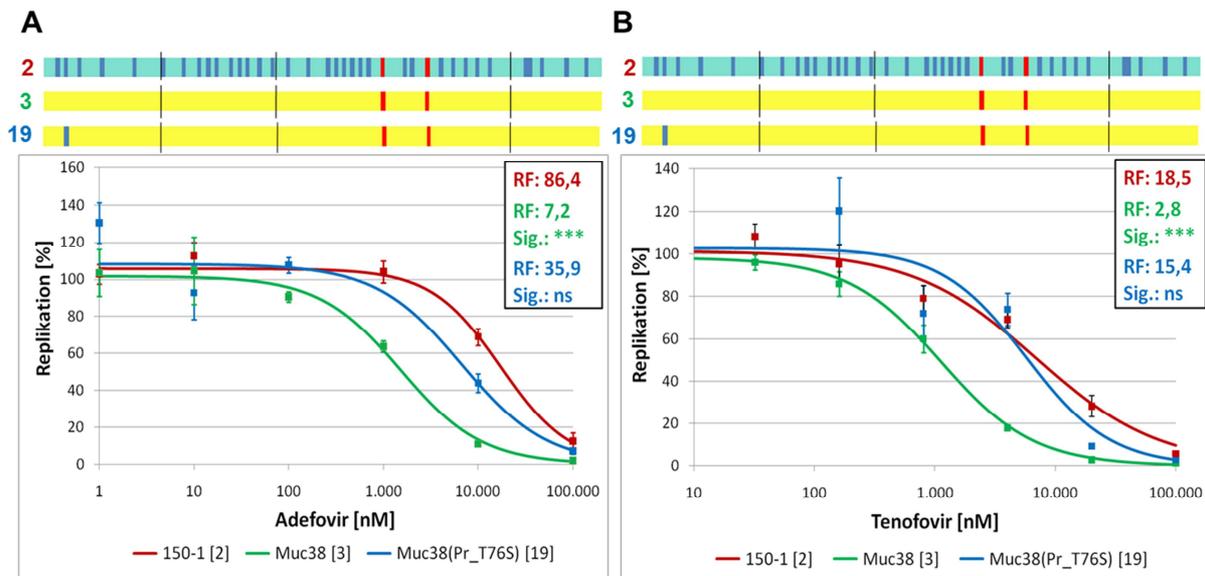


Abbildung 24: Einfluss der Mutation prT76S auf die Resistenz. Gezeigt sind die Resistenzprofile der Klone 150-1 (rot), Muc38 (grün) und Muc38(Pr_T76S) (blau). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitorikurven. **A:** Die Inhibition erfolgte mit Adefovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. **B:** Die Inhibition erfolgte mit Tenofovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Dieses Ergebnis wurde auch bei der Replikation des Klons WT(Pr_T76S) + 150-(RT) beobachtet, der den kompletten RT-Bereich des Klons 150-1 zusammen mit der einzelnen Mutation prT76S in der Primer-Domäne der HBV-Polymerase enthält (Abbildung 25 C/D). Bei beiden NAs weist dieser Klon sogar einen höheren RF-Wert als der Klon 150-1 auf, der jedoch nicht signifikant ist.

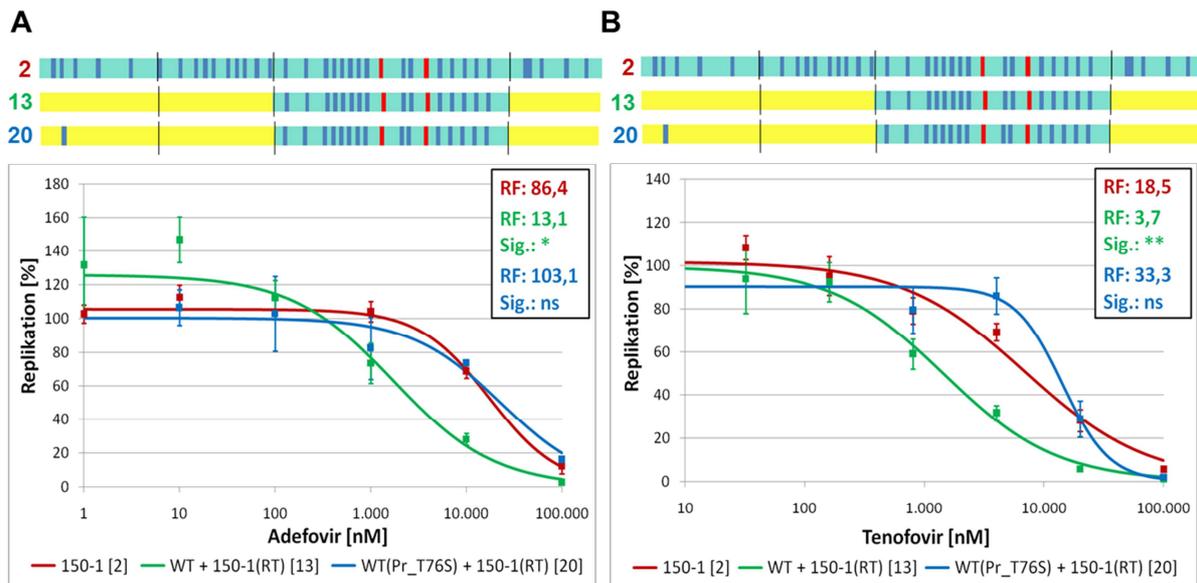


Abbildung 25: Einfluss der Mutation prT76S in Kombination mit den RT-Mutationen des Klons 150-1 auf die Resistenz. Gezeigt sind die Resistenzprofile der Klone 150-1 (rot), WT + 150-1(RT) (grün) und WT(Pr_T76S) + 150-1(RT) (blau). Der Versuch wurde mit HepG2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist die Replikation der Klone in % gegen die Konzentration des jeweiligen NA. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen sowie deren Standardfehler und die Inhibitionskurven. **A:** Die Inhibition erfolgte mit Adefovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. **B:** Die Inhibition erfolgte mit Tenofovir. Der Resistenzfaktor (RF) bezieht sich jeweils auf den Wildtyp, wohingegen sich die Signifikanz aus dem Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet. Das α -Niveau wurde nach Bonferroni berechnet, woraus sich folgende Grenzen für die Signifikanz ergaben: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Dargestellt über den Graphen ist jeweils die schematische Darstellung der Polymerase, der Klone, die in diesem Ansatz getestet wurden.

Die phänotypische Untersuchung der verschiedenen Klone in HepG2-Zellen hat somit deutlich gezeigt, dass die Mutation prT76S in der Primer-Domäne des Klons 150-1 für dessen hohe Resistenz verantwortlich ist (Tabelle 5). Zusammen mit den Primärmutationen rtA181V und rtN236T wurde hier somit erstmals eine Sekundärmutation außerhalb der RT-Domäne der HBV-Polymerase beschrieben, die eine Resistenz gegen die NAs Adefovir und Tenofovir hervorruft.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Resistenzprofile der in HepG2-Zellen phänotypisch untersuchten HBV-Klone. Dargestellt sind der Wildtyp, das Patientenisolat 150-1 und verschiedene Klone, die mit Adefovir und Tenofovir inhibiert wurden. Der Resistenzfaktor (RF₅₀) bezieht sich auf den Wildtyp, wohingegen die Signifikanz (Sig.) im Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet wurde. Nach der Inhibition mit Adefovir: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. Nach der Inhibition mit Tenofovir: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. Das Bestimmtheitsmaß (R²) der Kurven ist in der rechten Spalte angegeben. grün: keine Resistenz im Vergleich zum Wildtyp; gelb: leicht erhöhte Resistenz (für Adefovir: RF 2 bis 15, für Tenofovir: RF 2 bis 10); rot: deutlich erhöhte Resistenz (für Adefovir: RF > 15, für Tenofovir: RF > 10); nb: nicht bestimmt.

Mutante	Adefovir			Tenofovir		
	RF ₅₀	Sig.	R ²	RF ₅₀	Sig.	R ²
[1] Wildtyp	1,0	***	0,98	1,0	***	1,00
[2] 150-1	86,4		0,99	18,5		0,98
[3] Muc38	7,2	***	1,00	2,8	***	1,00
[9] 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K)	nb	nb	nb	6,6	*	1,00
[13] WT + 150-1(RT)	13,1	*	0,93	3,7	**	0,99
[14] WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT)	nb	nb	nb	23,6	ns	0,93
[16] 150-1(Pr_N73H)	37,3	ns	0,90	36,6	ns	0,96
[17] 150-1(Pr_S76T)	10,3	**	0,94	3,5	***	0,99
[18] 150-1(Pr_E90K)	66,4	ns	0,89	16,4	ns	0,99
[19] Muc38(Pr_T76S)	35,9	ns	0,93	15,4	ns	0,91
[20] WT(Pr_T76S) + 150-1(RT)	103,1	ns	0,96	33,3	ns	0,97

4.2 Untersuchung des Therapieverlaufs chronisch infizierter Woodchucks durch den Nachweis von WHsAg in der Laurell-Elektrophorese

Im humanen System wird seit einigen Jahren vorwiegend während der Therapie mit Interferon aber auch hochwirksamen Nukleos(t)id-Analoga (z.B. Tenofovir, Entecavir) begleitend das HBsAg quantitativ im Serum bestimmt. Die Menge an HBsAg im Serum dient mittlerweile als Biomarker für die Anzahl und Aktivität der HBV-cccDNA-Moleküle in infizierten Hepatozyten von chronischen Hepatitis-B-Patienten. Da für das wichtige Woodchuck-Modell kein kommerzielles System zur Bestimmung des WHsAg verfügbar ist, wurden die Proben von verschiedenen Therapieverläufen von chronisch WHV-infizierten Woodchucks mithilfe der im Institut entwickelten Laurell-Elektrophorese untersucht. Dazu wurde das Serum von chronisch mit WHV infizierten Woodchucks, die auf unterschiedliche Weise antiviral behandelt wurden, in verschiedenen Verdünnungen in die Elektrophorese eingesetzt (3.11). Mithilfe eines bekannten Standards [135] konnte dann die WHsAg-Konzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden. Anhand dieses Wertes sollte dann auf einen möglichen Therapieerfolg geschlossen werden.

4.2.1 Quantitative Bestimmung des WHsAg mit der Laurell-Elektrophorese

Mit der Laurell-Elektrophorese ist es möglich frei zirkulierendes Antigen im Blut nachzuweisen. Für die Quantifizierung der jeweiligen Probe wurde eine Verdünnungsreihe aus gereinigtem WHsAg eines WHV-haltigen Serums eines Woodchucks eingesetzt (aus Serum 5413, Abbildung 26) [134]. Aus der Höhe der Präzipitationsbögen dieses WHsAg wurde eine Standardgerade ($R^2 = 0,9885$) erstellt. Die Funktion dieser Standardgerade wurde für die Berechnung der WHsAg-Konzentration der verschiedenen Proben verwendet.

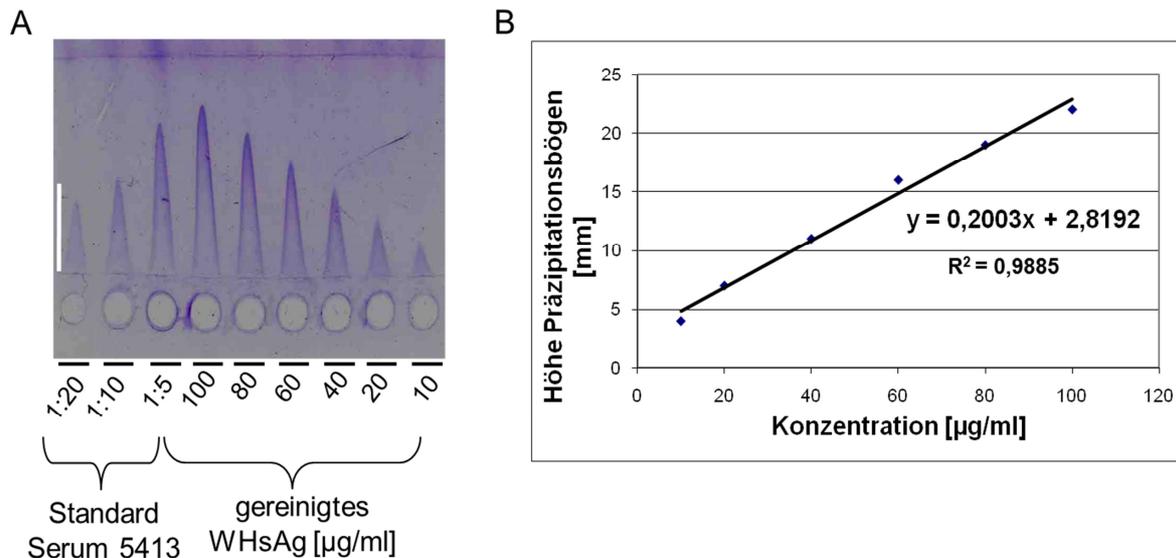


Abbildung 26: Laurell-Elektrophorese des Standardserums 5413, sowie des gereinigten WHsAg. A: Das aus dem Serum gereinigte WHsAg diente zur Ermittlung der Standardgeraden und lag hochrein in definierten Konzentrationen vor (10 - 100 µg/ml). Das Standardserum wurde in den Verdünnungen 1:20, 1:10 und 1:5 eingesetzt. Der Maßstabsbalken (weiß) entspricht einer Länge von 10 mm. B: Standardgerade aus gereinigtem WHsAg. Mithilfe der ermittelten und hier dargestellten Funktion der Geraden wurde die WHsAg-Konzentration der verschiedenen Proben ermittelt. R^2 : Bestimmtheitsmaß

4.2.2 WHsAg-Konzentration im Blut chronisch infizierter Woodchucks nach Therapie mit neuartiger DNA-Impfung

Um Erfolge von verschiedenen Therapien zu untersuchen ist der Woodchuck (*Marmota monax*) ein geeignetes und anerkanntes Tiermodell. Die Abnahme des WHsAg-Spiegels ist dabei ein wesentlicher Biomarker für den Therapieerfolg. In der Arbeitsgruppe von M. Roggendorf, Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen wurden chronisch mit WHV infizierte Woodchucks mit einer Kombination aus Entecavir und DNA Vakzin behandelt [145]. Ziel der Untersuchung war es, mithilfe dieses auf adenoviralen Vektoren basierenden Vakzins $CD8^+$ T-Zellen zu stimulieren, wodurch eine WHcAg-spezifische T-Zellantwort ausgelöst werden sollte. Im Rahmen meiner Arbeit wurde anschließend die WHsAg-Konzentration im Blut mit der Laurell-Elektrophorese quantifiziert. Sämtliche Tierversuche und weitere Untersuchungen wurden in Essen durchgeführt.

Die Woodchucks wurden zunächst über einen Zeitraum von 23 Wochen mit Entecavir behandelt, um die Viruslast im Blut zu senken und damit den Effekt der Impfung zu verstärken. Dabei wurde für 12 Wochen zunächst 1,4 mg Entecavir pro Woche verabreicht. Ab Woche 8 wurden zusätzlich subkutan 2 mg pro Woche gegeben. In den Wochen 8, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 25 und 27 wurden jeweils die DNA-Impfstoffe verabreicht (Abbildung 27). Dabei wurden vier unterschiedliche Impfstoffe eingesetzt, die Plasmide enthielten, die jeweils das WHsAg oder das WHcAg exprimieren.

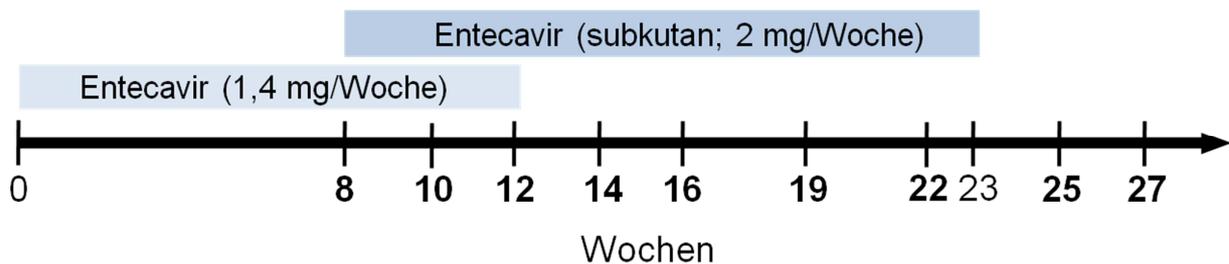


Abbildung 27: Behandlungsplan chronisch infizierter Woodchucks. Der schwarze Pfeil zeigt die Zeit in Wochen an, die blauen Boxen stellen die Gabe der unterschiedlichen Konzentrationen an Entecavir dar. Fett: Zeitpunkte der Gabe der DNA Impfstoffe. Es wurden 4 unterschiedliche Vakzine verabreicht, die Plasmide enthielten, die entweder das WHsAg oder das WHcAg exprimieren.

Ein wichtiger Nachweis für den Erfolg dieser Therapie ist die WHsAg-Konzentration im Serum. Diese wurde mit der Laurell-Elektrophorese bestimmt. In dieser Arbeit wurden die Tiere 61792, 61793, 61786 und 61795 untersucht und deren WHsAg-Konzentration über den gesamten Zeitraum der Therapie und darüber hinaus bestimmt (Tabelle 9, Anhang). Das Tier 61795, welches lediglich mit Entecavir behandelt wurde, diente dabei als Kontrolle.

Im Blut des Tieres 61792 lag zu Beginn der Behandlung eine WHsAg-Konzentration von 96,2 µg/ml und eine Viruslast von etwa 1×10^{10} GE/ml vor (Abbildung 28 A). Bei dem Tier kam es während der Therapie zu einem Abfall der WHsAg-Konzentration, die mit der Viruslast korrelierte. Ab der 12. Woche konnte nur noch eine geringe Menge WHsAg nachgewiesen werden, die jedoch nicht mehr quantifizierbar war. Ab Woche 52 war kein WHsAg mehr nachweisbar. Es kam auch nach Ende der Therapie zu keinem Anstieg des WHsAg im Blut.

Das Tier 61793 wies dagegen mit 424,32 µg/ml eine etwa 4-mal höhere WHsAg-Konzentration im Blut auf (Abbildung 28 B). Auch bei diesem Tier kam es während der Therapie zu einem Abfall der WHsAg-Konzentration, die mit der Viruslast korrelierte. Es kam jedoch zu keiner vollständigen Elimination des WHsAg, da das Tier nach Woche 31 aufgrund

einer bakteriellen Infektion euthanisiert werden musste. Am Ende der Messung lagen jedoch nur noch 23 % der Ausgangskonzentration des WHsAg im Blut vor.

Bei dem Tier 61786 kam es erst ab Woche 8 zu einem Abfall der WHsAg-Konzentration (Abbildung 28 C). Nach Ende der Therapie in Woche 27 war jedoch wieder ein leichter Anstieg der WHsAg-Konzentration zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt kam es auch zu einem Wiederanstieg der Viruslast. Am Ende der Messung war die Endkonzentration des WHsAg jedoch im Vergleich zum Ausgangswert um 83 % gesunken.

Bei dem Kontrolltier 61795 blieb die WHsAg-Konzentration zu Beginn der Entecavir-Therapie weitestgehend konstant (Abbildung 28 D). Ab Woche 8 kam es dann zu einem leichten Absinken, welches jedoch weniger deutlich, als bei den zusätzlich mit den DNA-Vakzinen behandelten Woodchucks war. Nach dem Absetzen der Entecavir-Therapie und gegen Ende der Dokumentation (Woche 29 - 33) kam es dann wieder zu einem Anstieg des WHsAg, sodass am Ende (Woche 33) sogar eine etwas höhere WHsAg-Konzentration als zu Beginn der Therapie vorlag.

Insgesamt kam es bei allen Woodchucks, die mit Entecavir und DNA-Vakzinen behandelt wurden zu einem Abfall der WHsAg-Konzentration im Blut. Es konnte jedoch nur bei dem Woodchuck 61792 eine komplette Elimination des WHsAg auch mehrere Wochen nach Ende der Therapie beobachtet werden.

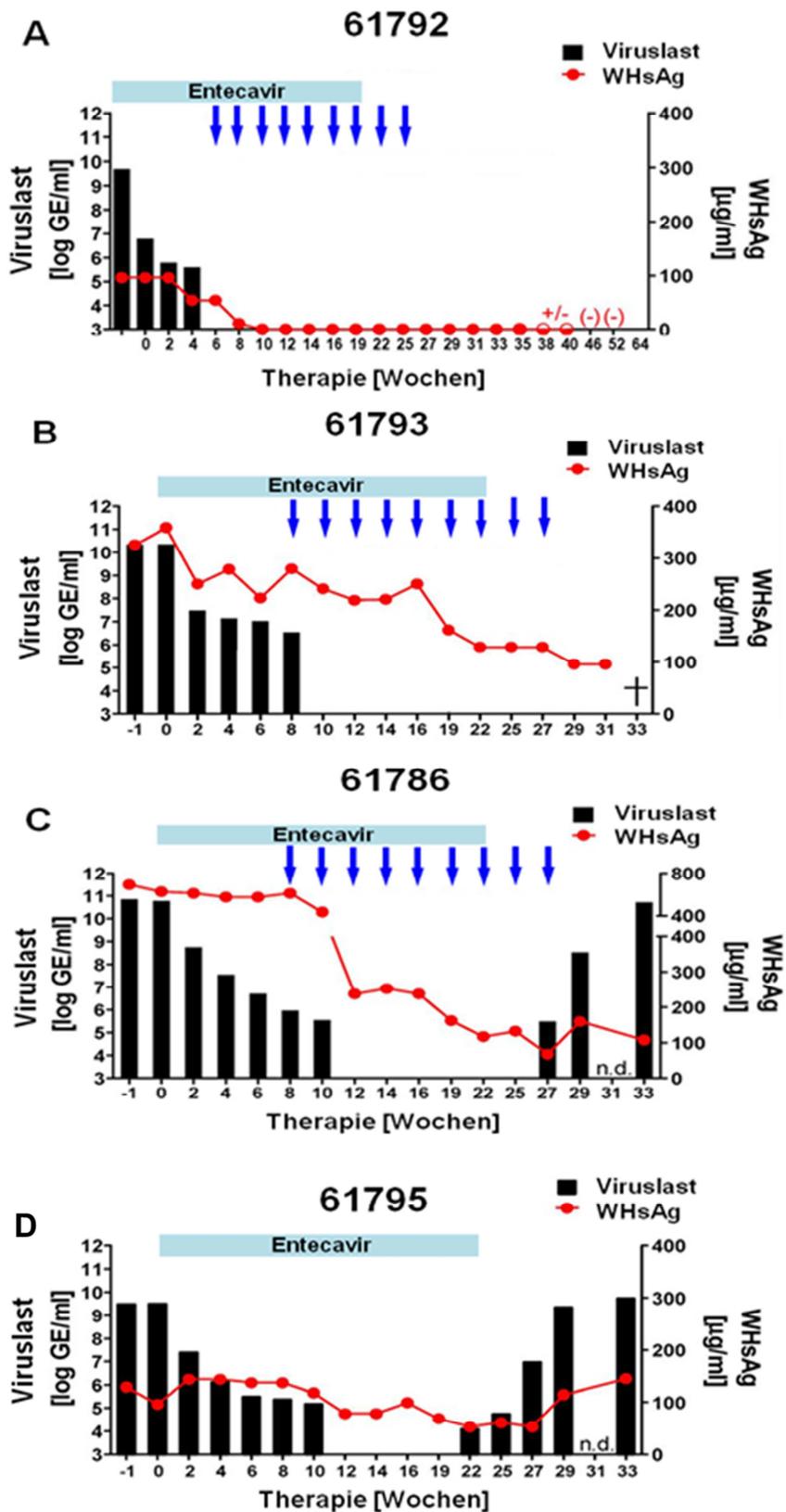


Abbildung 28: WHsAg und Viruslast chronisch infizierter Woodchucks nach Entecavir-Therapie und Behandlung mit DNA-Vakzinen. A-C: Die Tiere wurden zunächst für 23 Wochen mit Entecavir (blauer Querbalken) behandelt und anschließend ab Woche 8 mit DNA-Vakzinen therapiert (blaue Pfeile). D: Das Tier 61795 wurde für 23 Wochen ausschließlich mit Entecavir behandelt und diente als Kontrolle. Zu verschiedenen Zeiten wurden Blutproben entnommen und die Viruslast (schwarze Balken) sowie das WHsAg (rot) bestimmt. Bei den Tieren 61792 und 61793 konnte zudem anti-WHsAg festgestellt werden (grüner Querbalken). Verändert nach [145].

4.2.3 WHsAg-Konzentration im Blut chronisch infizierter Woodchucks nach Impfung mit DNA-Vakzin und Gabe von PD-L1-Antikörpern

In einer weiteren Studie wurden in der AG Roggendorf, Universitätsklinikum Essen chronisch infizierte Woodchucks mit einer Kombinationstherapie aus Entecavir, einem DNA-Vakzin für die Expression von WHsAg und WHcAg und PD-L1 Antikörpern behandelt [146]. Wie oben beschrieben induziert die Gabe von Entecavir zusammen mit DNA-Vakzinen eine spezifische Immunantwort [145]. Dadurch wurden die WHV-Replikation und die WHsAg-Produktion unterdrückt. Dies führte jedoch nicht in allen Fällen zu einer gesteigerten T-Zell Antwort, die zum Verlust von infizierten Hepatozyten führen sollte. Daher wurde in der neuen Studie [146] zusätzlich zur Verabreichung von Entecavir und DNA-Vakzine die PD-1 Aktivierung auf T-Zellen durch die Gabe von anti-PD-L1 Antikörpern gestoppt. Bei PD-1 handelt es sich um den *programmed death-1* Rezeptor auf T-Zellen, der bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-B-Infektion häufig erhöht ist. Durch die Inhibition des Liganden PD-L1 durch entsprechende Antikörper sollte es zu einer gesteigerten Immunantwort durch T-Zellen kommen.

Für diese Untersuchungen wurden die chronisch infizierten Woodchucks 70102, 70104 und 70108 eingesetzt. Diese wurden zunächst für 28 Wochen mit Entecavir behandelt. Dabei wurden für die ersten 12 Wochen osmotische Pumpen verwendet und täglich 0,2 mg Entecavir verabreicht. Ab Woche 10 wurde zusätzlich für 18 Wochen jeweils einmal 1,5 mg Entecavir pro Woche injiziert. Den Tieren wurde zudem ab Woche 12 alle 2 Wochen eine Dosis des DNA-Vakzins für die Expression des WHcAg und des WHsAg intramuskulär verabreicht. In Woche 24 wurden an den Tagen 1, 4 und 7 polyklonale *rabbit anti-woodchuck* PD-L1 Antikörper injiziert (Abbildung 29).

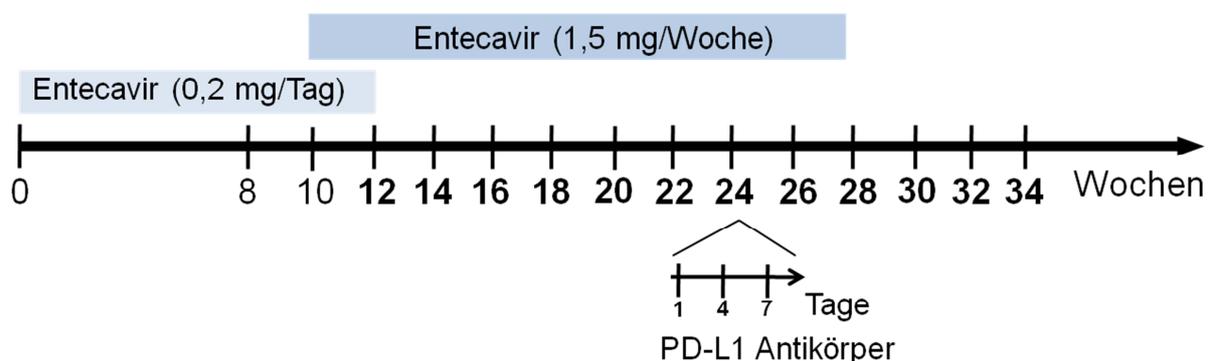


Abbildung 29: Behandlungsplan chronisch infizierter Woodchucks. Der schwarze Pfeil zeigt die Zeit in Wochen an, die blauen Boxen stellen die Gabe der unterschiedlichen Konzentrationen an Entecavir dar. Fett: Zeitpunkte der Gabe des DNA-Impfstoffs. In der 24. Woche wurden zudem an den Tagen 1, 4 und 7 anti-PD-L1 Antikörper injiziert.

Die Bestimmung der WHsAg-Konzentration im Blut der Woodchucks während der Therapie und in der Zeit danach durch die Laurell-Elektrophorese war Bestandteil dieser Arbeit (Tabelle 10, Anhang).

Bei dem Tier 70102 lag zu Beginn der Therapie eine sehr hohe WHsAg-Konzentration von 698,32 $\mu\text{g/ml}$ vor. Unter der Entecavir-Therapie, aber noch vor der Vakzinierung kam es zu einem starken Abfall des WHsAg im Blut. Anschließend konnte ein leichter Anstieg bis Woche 14 beobachtet werden, woraufhin die WHsAg-Konzentration wieder stark abnahm und am Ende der Therapie bei etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ lag. Zwei Wochen nach Ende der Therapie kam es wieder zu einem starken Anstieg. Bei der letzten Messung lag die WHsAg-Konzentration bei 911,78 $\mu\text{g/ml}$ und war damit höher als die Ausgangskonzentration (Abbildung 30 A).

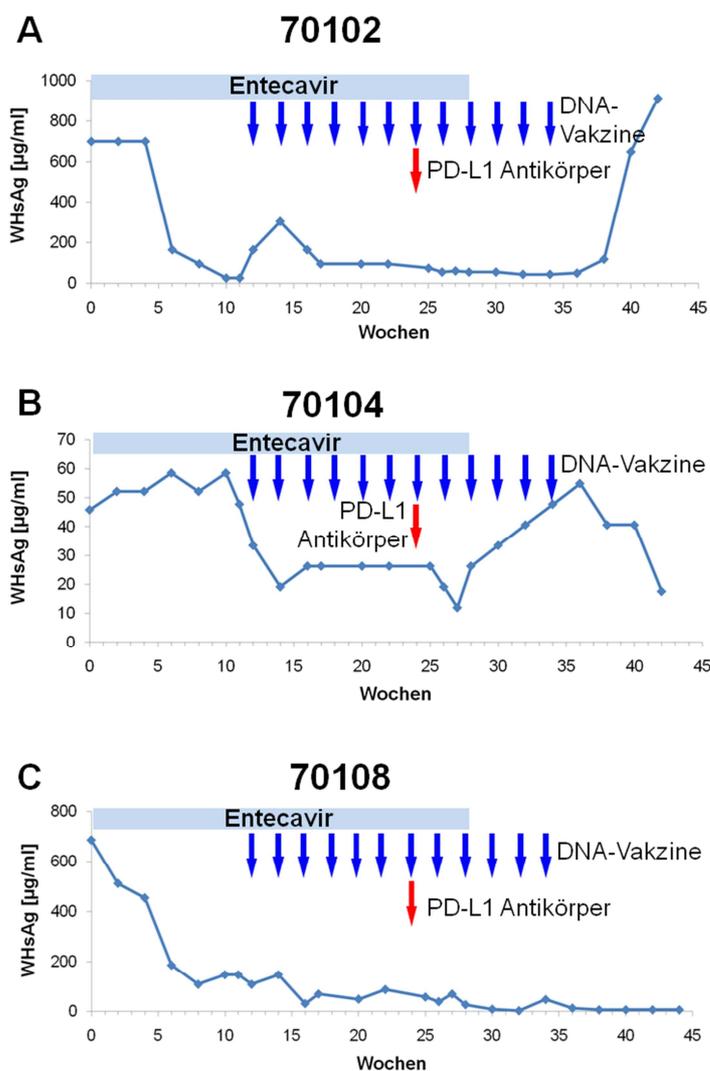


Abbildung 30: Bestimmung der WHsAg-Konzentration nach der Therapie mit Entecavir, DNA-Vakzin und PD-L1 Antikörpern. Die Tiere wurden zunächst mit Entecavir behandelt (blauer Querbalken) und erhielten ab Woche 12 jede zweite Woche eine Injektion mit dem DNA-Vakzin (blaue Pfeile). In Woche 24 wurden an 3 Tagen anti-PD-L1 Antikörper injiziert. Die Bestimmung der WHsAg-Konzentration erfolgte mit der Laurell-Elektrophorese.

Bei dem Woodchuck 70104 lag die WHsAg-Ausgangskonzentration mehr als zehnfach niedriger (45,82 µg/ml). Hier setzte unter der alleinigen Entecavir-Therapie keine Verringerung der WHsAg-Menge im Serum ein. Nach Beginn der Vakzinierung kam es zunächst zu einem Abfall der WHsAg-Konzentration in Woche 14, der nachfolgend jedoch wieder 9 Wochen lang auf einem Niveau von ca. 25 µg/ml verblieb. Die anti-PD-L1-Antikörper-Gabe in Woche 24 führte in Woche 26 und 27 zu einem kurzzeitigem Abfall der WHsAg-Konzentration bis zu dem niedrigsten Wert (11,92 µg/ml) der Messungen in Woche 27. Ab Woche 28 stieg das WHsAg im Serum jedoch wieder leicht an, bis in Woche 36 ein höherer Wert als zu Beginn vorlag. Nach dem Ende der Therapie, begann der Wert jedoch wieder zu sinken. Am Ende der Messung lag der Wert bei 25,61 µg/ml, was etwa der Hälfte der Ausgangskonzentration entspricht (Abbildung 30 B).

Das Tier 70108 hatte wiederum eine sehr hohe WHsAg-Ausgangskonzentration (686,42 µg/ml). Zu Beginn der Entecavir-Therapie kam es zu einem starken Abfall der WHsAg-Konzentration bis 108,8 µg/ml (Woche 8), der jedoch auf diesem Plateau bis Woche 14 mit leichten Schwankungen verblieb. Erst nach drei DNA-Vakzinierungen erfolgte dann ein weiterer Abfall in Woche 16 (31,2 µg/ml) und eine Plateaubildung über mehrere Wochen bei ca. 50µg/ml. Die anti-PD-L1-Antikörper-Gabe in Woche 24 führte in Woche 25 und 26 zu einem kurzzeitigem Abfall der WHsAg-Konzentration. Bis auf leichte Schwankungen, kam es zu keiner weiteren Erhöhung der WHsAg-Konzentration, die am Ende der Messung konstant nur noch bei 6,32 µg/ml lag (Abbildung 30 C).

Insgesamt kam es durch die Kombinationstherapie aus Entecavir, dem DNA-Vakzin und dem PD-L1 Antikörper zu einem dauerhaften Absinken der WHsAg-Konzentration bei 2 von 3 Tieren, die auch 12 Wochen nach der Therapie zu erkennen war. Bei keinem Tier konnte jedoch ein vollständiger Verlust des WHsAg erreicht werden, bei dem Woodchuck 70102 kam es nach dem Ende der Therapie sogar zu einem starken Anstieg der WHsAg-Konzentration.

4.3 Untersuchung des SHBs verschiedener Genotypen anhand des WHO-Genotypen-Panels

Im vorherigen Abschnitt wurde die Bedeutung des Oberflächen-Antigen-Spiegels (HBsAg, WHsAg) bei chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektionen deutlich. Im Gegensatz zu WHV gibt es bei HBV mehrere Genotypen, die in der quantitativen HBsAg-Bestimmung je nach Testsystem zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Das für diese Zwecke eingeführte WHO-Genotypen-Panel sollte auch zur Standardisierung der HBsAg-Bestimmung beitragen (1.1.3).

Da die Seren des WHO-Genotypen-Panels für die Produktion eines HBsAg-Standards nur in stark limitierter Menge vorliegen, wurden stabile Zelllinien hergestellt, welche rekombinantes HBsAg unterschiedlicher HBV-Genotypen exprimieren, das dann in großer Menge und mit gleichbleibender Qualität produziert werden kann.

Um die SHBs Produktion verschiedener Genotypen zu vergleichen, wurde das WHO-Genotypen-Panel verwendet. Dazu wurde die HBV-DNA direkt aus den jeweiligen Patientenseren isoliert und über eine spezifische PCR amplifiziert. Die SHBs-Domänen wurden dann in den Vektor pCEP-Puro kloniert und in HeLa Zellen transfiziert. Das episomal stabile Konstrukt kann sich dann in den eukaryotischen Zellen vermehren und erlaubt die Selektion transfizierter Kulturen mittels Puromycin.

4.3.1 Optimierung der SHBs Produktion

Nach der Klonierung des SHBs in den Expressionsvektor pCEP-Puro wurde zunächst eine Zelllinie ermittelt, die ausreichende Mengen an SHBs exprimiert. Dazu wurde das Plasmid mit dem SHBs des Genotyps D1 verwendet. Dieses wurde in Huh7 und HeLa Zellen transfiziert. Nach der Puromycin-Selektion wurden von den konfluenten Platten die Zellkulturüberstände abgenommen und das SHBs in einem EIA mit dem HB1 Antikörper quantifiziert (3.12). Dabei konnte bei den HeLa Zellen 1,7 ng/ml SHBs und bei den Huh7-Zellen 1,4 ng/ml nachgewiesen werden (Abbildung 31). Die 1:10 verdünnten Proben lagen jeweils unter der Nachweisgrenze und waren daher nicht mehr quantifizierbar. Da es bezüglich der Produktion von SHBs damit kaum einen Unterschied gab, wurde die besser zu selektierende HeLa-Zelllinie für die Transfektion der Expressionsplasmide verwendet.

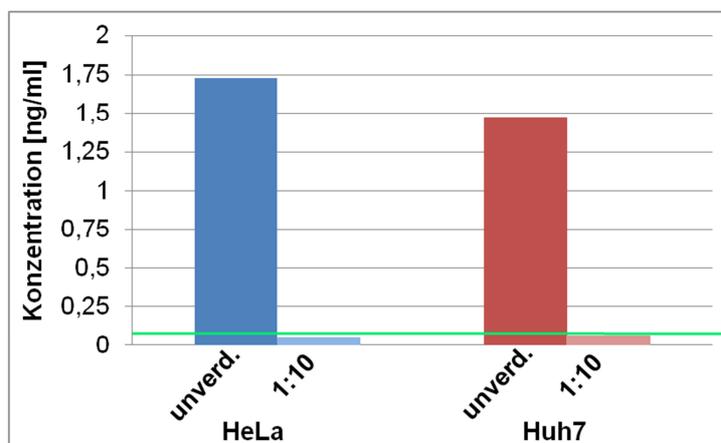


Abbildung 31: Vergleich unterschiedlicher Zelllinien bezüglich der SHBs Produktion. Das Expressionsplasmid pCEP-Puro mit der S-Domäne des Genotyps D1 wurde in HeLa und in Huh7-Zellen transfiziert. Nach der Selektion mit Puromycin wurde unter fortgeführter Zugabe von Puromycin gewartet, bis die Platten dicht bewachsen waren. Anschließend wurde die SHBs Konzentration im Zellkulturüberstand im EIA mit dem Antikörper HB1 quantifiziert. Die Proben wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt eingesetzt. Die grüne Linie markiert die Nachweisgrenze.

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die FKS-Konzentration die Produktion des SHBs in HeLa-Zellen beeinflusst. Dazu wurde das Plasmid mit dem SHBs des Genotyps D1 in HeLa Zellen transfiziert. Nach der Selektion wurden die Zellen aufgeteilt und in DMEM mit unterschiedlichen FKS Konzentrationen von 0 bis 10 % inkubiert. Für die Quantifizierung wurde anschließend ein EIA mit dem HB1 Antikörper durchgeführt. Bei 0 % FKS konnte eine SHBs-Konzentration von 1,5 ng/ml nachgewiesen werden. Bei 0,1 % bzw. 1 % FKS wurden 1,8 bzw. 2,1 ng/ml SHBs festgestellt. Wurden die Zellen mit 5 % FKS inkubiert, wurde eine SHBs-Konzentration von 2,9 ng/ml nachgewiesen. Die höchste Konzentration mit 3,1 ng/ml wurde bei 10 % FKS gemessen. In den weiteren Versuchen wurden die Zellen daher immer in 10 %-igem FKS DMEM inkubiert.

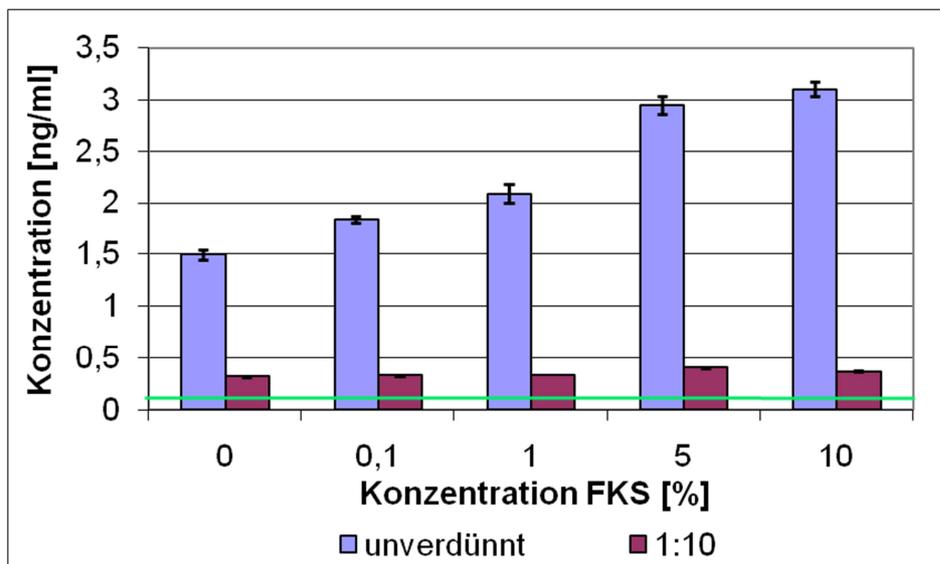


Abbildung 32: SHBs-Produktion in Abhängigkeit der FKS-Konzentration bei der Selektion. HeLa Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Expressionsplasmid für das SHBs des Genotyps D1 mit unterschiedlichen Konzentrationen FKS inkubiert und mit Puromycin (3 µg/ml) selektioniert. Nachdem die Platten wieder dicht bewachsen waren, wurde das SHBs aus dem Zellkulturüberstand in einem EIA mit dem Antikörper HB1 quantifiziert. Die Proben wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt eingesetzt. Die grüne Linie markiert die Nachweisgrenze.

4.3.2 Reaktivität der verschiedenen Genotypen im eigenen EIA-System und im kommerziellen System (Architect, Abbott)

Nachdem geeignete Bedingungen für die Inkubation der Zellen und Produktion des SHBs ermittelt wurden, wurden die Plasmide für die Expression der übrigen Genotypen stabil in HeLa Zellen transfiziert. Das SHBs in den Überständen wurde anschließend im EIA und dem Architect I2000-System (Abbott) gemessen. Im EIA wurde der Antikörper C20/02 eingesetzt, der die S-Domäne des HBsAg konformationell erkennt (persönliche Mitteilung W. H. Gerlich, Gießen).

Für die hierzulande schwer erhältlichen Genotypen E, H und I lagen bis zu diesem Zeitpunkt noch keine stabilen, SHBs-produzierenden HeLa Zellen vor. Bei den übrigen Genotypen konnte jeweils ein Signal im EIA und dem Architect Immun Assay nachgewiesen werden (Abbildung 33, Tabelle 6). Bei dem Genotyp A1 wurde dabei die höchste SHBs-Konzentration mit dem Architect und dem Antikörper C20/02 nachgewiesen. Auch das SHBs der Genotypen A2, B1, B2, C2, D1 und G wurde in gleichem Maße vom Architect und dem Antikörper C20/02 erkannt. Dies konnte man auch bei dem Genotyp D3 beobachten. Hier wurde insgesamt die geringste Konzentration an SHBs detektiert. Das SHBs des Genotyps F2 wurde durch das Architect-System deutlich besser erkannt, als mit dem eigenen EIA-System mit dem „Capture-Antikörper“ C20/02.

Insgesamt wurden stabil transfizierte Zelllinien hergestellt, die SHBs von verschiedenen Genotypen exprimieren. Es konnten alle hier eingesetzten Genotypen durch die verschiedenen Systeme im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Der diagnostische Nachweis durch den Architect I2000, Abbott ist bei allen Genotypen sicher möglich und zeigte vor allem bei dem SHBs des Genotyps F2 einen deutlichen Vorteil gegenüber dem Nachweis durch den Antikörper C20/02.

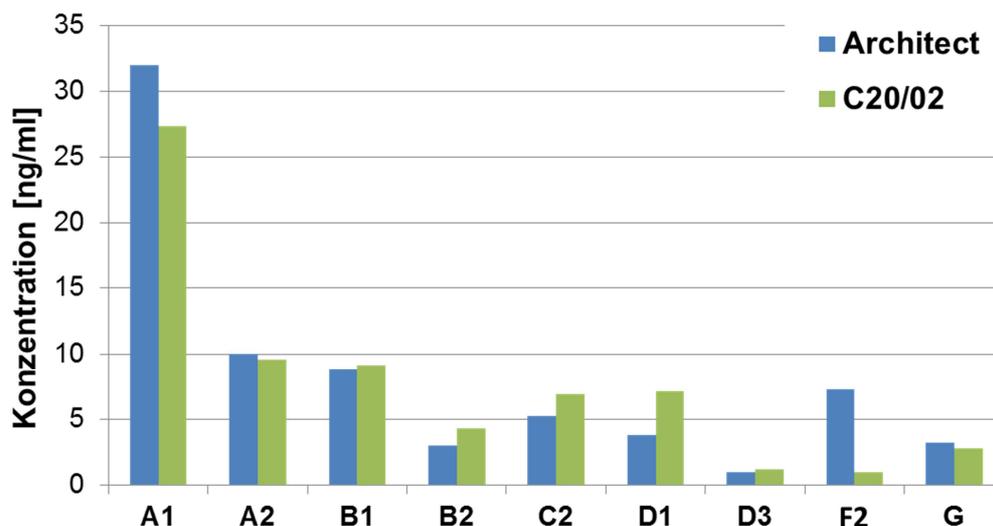


Abbildung 33: Nachweis der SHBs Produktion der verschiedenen Genotypen. HeLa Zellen wurden nach der Transfektion mit dem jeweiligen Expressionsplasmid für das SHBs der unterschiedlichen Genotypen in 10%-igem FKS DMEM inkubiert und mit Puromycin (3 µg/ml) selektioniert. Nachdem die Platten wieder dicht bewachsen waren, wurde mit den Zellkulturüberständen jeweils ein EIA mit dem Antikörper C20/02 durchgeführt, um die SHBs-Konzentration bestimmen zu können. Zusätzlich dazu wurde die SHBs-Konzentration der Proben im Architect I2000, Abbott quantifiziert. Die Werte sind in ng/ml angegeben.

Tabelle 6: Nachweis der SHBs Produktion der verschiedenen HBV-Genotypen.

Genotyp	Interne Bezeichnung	Serotyp	Architect [IU/ml]	Architect [ng/ml]	EIA C20/02 [ng/ml]
A1	N4542	adw2	36,4	32,1	27,4
A2	N4879	adw2	11,4	10,0	9,6
B2	N4214	adw2	10,0	8,8	9,1
B2	N4222	adr	3,5	3,1	4,3
C1	N4227	adr	6,0	5,3	6,9
D1	N4203	ayw2	4,4	3,9	7,1
D3	N4595	ayw2	1,1	0,9	1,2
F2	N4494	adw4	8,3	7,3	1,0
G	V1659	adw2	3,7	3,3	2,9

5. Diskussion

5.1 Phänotypische Charakterisierung einer ungewöhnlichen HBV Variante aus einem chronischen HBV-Patienten (HBV-Klon 150-1)

Hintergrund und Vorarbeiten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HBV-Variante phänotypisiert, die ein außergewöhnliches Resistenzmuster nach antiviraler Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga aufweist. Dieser HBV-Klon (150-1) wurde aus einem chronischen Hepatitis-B-Patienten isoliert, der unter oraler Therapie mit dem Nukleotid-Analogen Adefovir eine starke Erhöhung der HBV-DNA-Konzentration im Blut zeigte. Dieser klinische HBV-Durchbruch führte dann zum Therapiewechsel von Adefovir zu Tenofovir (persönliche Mitteilung Dr. Florian van Bömmel, Sektion Hepatologie, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig, Deutschland), das eine bessere Wirksamkeit gegenüber HBV besitzt und besser verträglich ist [112]. Die anschließende Gabe von Tenofovir führte jedoch nur verzögert und unvollständig zu einer Abnahme der HBV-DNA-Konzentration im Blut des Patienten. Der hier untersuchte HBV-Klon 150-1 wurde aus dem Serum isoliert, welches kurz vor dem Wechsel zu der Tenofovir-Therapie abgenommen wurde. Hierbei wurde jedoch nur die HBV-Polymerase dieser HBV-Variante mittels PCR amplifiziert und in einen eukaryoten Expressionsvektor kloniert, der die fehlenden Genomanteile eines gut charakterisierten HBV-Wildtyp-Stamm des identischen HBV-Genotyps D bereitstellt [131]. Bei dem Klon 150-1 handelt es sich somit um eine Chimäre aus der HBV-Polymerase des Klons 150-1 und dem restlichen HBV-Genom des HBV-Wildtyps (pCH9-3091). Sowohl in meiner Masterarbeit [130], als auch in der Dissertation von A.Geipel [131] aus der AG Glebe, Gießen konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Klon auffällig viele Mutationen im Vergleich zu dem HBV-Wildtyp (pCH9-3091) aufweist. Er zeigte auch eine auffällig hohe Resistenz gegen die NA Adefovir, Lamivudin und Tenofovir, die bislang nicht erklärt werden konnten (Tabelle 7). Mit meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass auch Mutationen außerhalb der RT-Domäne eine wesentliche Rolle bei der antiviralen Resistenzbildung spielen können [130]. Für die Identifikation weiterer Resistenzmutationen wurden daher Austausche der einzelnen Domänen der Polymerase des Wildtyps und des Klons 150-1 durchgeführt. Die verschiedenen Klone wurden phänotypisch untersucht und dazu zunächst in Huh7- bzw. HepG2-Zellen transfiziert. Sie wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren Tenofovir und Adefovir inkubiert. Bei Tenofovir handelt es sich momentan um das in der Klinik bevorzugte NA, da es weniger stark nephrotoxisch als Adefovir ist [95] und bis

jetzt noch keine direkten Resistenzen bekannt sind. Da sich Adefovir und Tenofovir nur um eine Methylgruppe unterscheiden und beide damit eine hohe Strukturähnlichkeit aufweisen (Abbildung 5), führen Resistenzmutationen von Adefovir auch zu einer gewissen Resistenz gegen Tenofovir. Diese haben in der Klinik jedoch eine geringere Bedeutung, da Tenofovir in einer 30-fach höheren Dosis eingesetzt werden kann [95]. Für diese Untersuchungen wurde die Inhibition teilweise auch mit Adefovir durchgeführt, da aufgrund der höheren Resistenz eine Veränderung im RF deutlicher zu erkennen war.

Phänotypische Analyse der HBV-Polymerase des HBV-Klons 150-1

Die bereits bekannten Resistenzmutationen des Klons 150-1 sind die Mutationen rtA181V und rtN236T, die sich in der Reversen Transkriptase der HBV-Polymerase befinden und klassische Resistenzmutationen gegen Adefovir darstellen. Diese beiden Mutationen (rtA181V und rtN236T) sind in der HBV-Variante Muc38 enthalten, die ansonsten dem Wildtyp entspricht (Abbildung 11). Der hierbei mit Muc38 in HepG2-Zellen gegen Adefovir ermittelte Resistenzfaktor (RF) von 7,2 (Tabelle 7) entspricht den publizierten Erwartungen mit einem RF von 5-10 als höchste bekannte Resistenz gegen Adefovir [94, 147, 148]. Die Mutationen rtA181V und rtN236T ändern sehr wahrscheinlich die Position des DNA-Stranges zum katalytischen Zentrum der HBV-Polymerase und sorgen dafür, dass das Analogon Adefovir nicht mehr binden kann [149, 150]. Auch gegenüber Tenofovir zeigt der Klon Muc38 eine leichte Resistenz (bei Huh7-Zellen: RF=3,1; bei HepG2-Zellen: RF=3,5), was aufgrund der Strukturähnlichkeit der beiden NA zu erwarten war [93]. Die Mutation rtA181V führt auch zu einer Resistenz gegen Lamivudin um den Faktor 8-16 [93, 108, 151]. Damit liegt der in dieser Arbeit ermittelte RF von 4,8 bei HepG2-Zellen im erwarteten Bereich. Wie erwartet kommt es bei diesem Klon zu keiner Resistenz gegen Entecavir (Abbildung 11).

Der Klon 150-1 dagegen zeigte wiederholt 8 bis 10-fach höhere Resistenzfaktoren gegenüber Adefovir und Tenofovir (Tabelle 9), die nicht durch die bekannten Resistenzmutationen (rtA181V und rtN236T, wie in Muc38) zu erklären sind. Bereits in meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Mutationen rtA181V und rtN236T als Primärmutationen in der RT-Domäne vorliegen müssen, damit weitere, damals aber noch unbekannte Resistenzmutationen verstärkend auf die Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir wirken können [130]. In dieser Arbeit konnte dies nochmals bestätigt werden. Dazu wurden jeweils Polymerase-Chimären zwischen dem Klon 150-1 und dem Wildtyp in einem HBV-Expressionsklon kloniert. Wegweisend waren hier die Chimären bei denen die Primer/Spacer-Domäne (WT + 150-1(Pr;Sp); Abbildung 13 Nr. 4) und die RNaseH-Domäne (WT + 150-1(RH); Abbildung 13 Nr. 5) des Klons 150-1 in den HBV-Wildtyp pCH9-3091

einkloniert und phänotypisch untersucht wurden. Auch hier wurde deutlich, dass sowohl die speziellen Mutationen des Klons 150-1 in der Primer-/Spacer-Domäne als auch in der RNaseH-Domäne keine Resistenz bewirkten, wenn die essentiellen Mutationen im RT-Bereich (rtA181V und rtN236T) nicht vorhanden waren. Bei diesen zwei zentralen RT-Mutationen handelt es sich folglich um Primärmutationen, bei den weitere(n) gesuchte(n) Resistenzmutation(en) des Klons 150-1 daher um eine oder mehrere Sekundärmutation(en). Daher wurden die weiteren Untersuchungen der folgenden Chimären stets in Anwesenheit der Primärmutationen im RT-Bereich (rtA181V und rtN236T) durchgeführt.

Die ermittelten Resistenzfaktoren (RF) beziehen sich immer auf den in jedem Assay mitgeführten HBV-Wildtyp pCH9-3091. Aus allen Klonen wurde jeweils ein Konsensus aus den verschiedenen Assays gebildet, da gezeigt werden konnte, dass der Assay reproduzierbar ist und in jedem Ansatz vergleichbare Kurven erstellt werden konnten [130], [131]. Die in den Assays eingesetzten Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7 führen jedoch zu unterschiedlichen IC_{50} -Werten bei den gleichen Plasmiden. Bekanntermaßen kann man bei Huh7-Zellen eine höhere Transfektionsrate als bei HepG2-Zellen nachweisen [152]. HepG2-Zellen reagieren jedoch sensitiver auf NA als Huh7-Zellen [139], was die geringere IC_{50} bei HepG2-Zellen erklärt. Die Assays wurden zunächst in Huh7-Zellen durchgeführt, für die weitere Identifizierung der Resistenzmutation wurden die sensitiveren HepG2-Zellen verwendet. Außerdem waren HepG2-Zellen einfacher zu handhaben und führen laut Literatur zu einer mit der chronischen HBV-Infektion vergleichbaren Situation, was sich unter anderem daran zeigt, dass sie eine ähnliche Menge an Filamenten exprimieren wie die infizierte Leber. [153]. Zudem konnte durch die Verwendung zweier Hepatomzelllinien gezeigt werden, dass der nachgewiesene Effekt kein Artefakt einer speziellen Zelllinie ist, sondern auch für andere Hepatomzelllinien gilt.

Einfluss der Mutationen der RNaseH-Domäne auf die antivirale Resistenz des HBV-Klons 150-1

Eine Auswirkung von Mutationen innerhalb der RNaseH-Domäne des Klons 150-1 konnte ausgeschlossen werden. Sowohl ein Austausch der RNaseH-Domäne des Klons 150-1 zum Wildtyp (150-1 + WT(RH), Abbildung 13 Nr. 7) als auch der Austausch der RNaseH-Domäne des Klons Muc38 zu der des Klons 150-1 (Muc38 + 150-1(RH), Abbildung 13 Nr. 6) verursachten keine signifikante Veränderung der Resistenz gegenüber Tenofovir. Dies deckt sich mit den genotypischen Untersuchungen von H. Niekamp, der zeigen konnte, dass es sich bei den Mutationen in der RNaseH-Domäne um Polymorphismen handelt [154].

Einfluss der Mutationen der Primer-/Spacer-Domäne auf die antivirale Resistenz des HBV-Klons 150-1

Beim Austausch der Primer/Spacer-Domäne des Klons 150-1 in den Klon Muc38 (Klon Muc38 + 150-1(Pr;Sp); Abbildung 13 Nr. 8) wurde eine dreifache Erhöhung des RF nachgewiesen (Tabelle 7). Die Kurve zeigte keinen signifikanten Unterschied mehr zu der des Klons 150-1. Man konnte daher davon ausgehen, dass eine oder mehrere der gesuchten sekundären Resistenzmutationen in der Primer/Spacer-Domäne des Klons 150-1 vorliegen sollten. Trotzdem war der RF des Klons 150-1 noch um den Faktor 2 höher. Dabei handelt es sich entweder Schwankungen des Assays, oder aber weitere Mutationen innerhalb der RT-Domäne sind für die vollständige Resistenz des Klons 150-1 verantwortlich.

Um nun die genaue Mutation zu bestimmen, wurden die einzelnen Mutationen, die im Unterschied zu dem Wildtyp pCH9-3091 vorlagen, einzeln über gerichtete Mutagenese aus dem Klon 150-1 entfernt. Aufgrund der hohen Variabilität der Spacer-Domäne und der Tatsache, dass bisher keine eindeutige Funktion der Spacer-Domäne neben einer Platzhalter („Spacer“) - Funktion zwischen der Primer und der RT-Domäne nachgewiesen werden konnte, wurden Mutationen aus diesem Bereich weitgehend vernachlässigt. Nur die erste Aminosäure der Spacer-Domäne wurde aufgrund ihrer Nähe zur Primer-Domäne mit in die Untersuchung eingeschlossen. Bei der anschließenden phänotypischen Untersuchung wurde deutlich, dass nur bei einem Set von drei Aminosäuren im Primerbereich (Klon 150-1-Pr_N73H,S76T,E90K) (Abbildung 13 Nr. 9) ein signifikanter Unterschied zu dem Klon 150-1 zu beobachten ist. Folglich musste eine Mutation oder eine Kombination aus den Mutationen prH73N, prT76S und prK90E als Sekundärmutation zur Erhöhung der Resistenz des Klons 150-1 beitragen. Diese Mutationen zeigten im Umkehrschluss auch nach Integration in den Klon Muc38 und dem Klon WT + 150-1(RT) eine Erhöhung der Resistenz (Muc38-(Pr_H73N,T76S,K90E), Abbildung 13 Nr. 15 und WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT), Abbildung 13 Nr. 14) (Abbildung 19). Diese als „Knock-in“ bezeichnete Variante war eine weitere Bestätigung dafür, dass eine dieser Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 alleine oder in Kombination essentiell für die hohe Antivirale Resistenz des Klons 150-1 ist. Auch bei diesen Klonen war wieder zu erkennen, dass die Resistenz des kompletten Klons 150-1 in Huh7-Zellen bei den Mutanten nicht vollständig erreicht wurde (Abbildung 19). Man kann spekulieren, dass noch weitere Mutationen an der Resistenz gegen Tenofovir beteiligt sind, jedoch ist hier vermutlich davon auszugehen, dass es sich eher um Schwankungen des Assays handelt. Für die Detektion der genauen Resistenzmutation wurden in dem Klon 150-1 die Mutationen an den Stellen 73, 76 und 90 (Abbildung 13 Nr. 16-18) einzeln über gerichtete Mutagenese zu den Aminosäuren des Wildtyps mutiert („knock-out“). Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass ausschließlich die Entfernung der Mutation prT76S zu

einer signifikanten Verringerung des RF gegen Adefovir und Tenofovir führt. Im Umkehrschluss erzielte die Einführung der entsprechenden Mutation („knock-in“) in dem Klon Muc38 (Muc38(Pr_T76S), Abbildung 13 Nr. 19) und in dem Klon WT + 150-1(RT) (WT(Pr_T76S) + 150-(RT), Abbildung 13 Nr. 20) zu einer Erhöhung der Resistenz, die bei den NA Adefovir und Tenofovir in der Signifikanz-Bestimmung nicht von der des Klons 150-1 unterschieden werden konnte.

Damit konnte mit der Mutation prT76S erstmals eine Resistenzmutation außerhalb der RT-Domäne identifiziert werden, die als Sekundärmutation zusammen mit den Primärmutationen rtA181V und rtN236T die vorbestehende Resistenz gegen Adefovir und vor allem Tenofovir steigert. Diese Kombination an Mutationen bewirkt dann die höchste jemals in der Literatur beschriebene Resistenz gegen Adefovir und Tenofovir *in vitro*. Dies deckt sich mit den davon unabhängigen Untersuchungen von H. Niekamp (AG Glebe, Gießen), der zeigen konnte, dass die Position prT76 in allen Wildtyp-HBV-Genotypen hochkonserviert ist [154]. Insgesamt konnte die hier analysierte Mutation prT76S bei der ausführlichen Suche (4000 AS-Sequenzen) in verschiedenen Datenbanken in keinem anderen Klon gefunden werden [154]. Dies ist vermutlich aber darauf zurückzuführen, dass sich andere Studien, die sich mit Resistenzuntersuchungen gegen NA beschäftigen, ausschließlich auf die RT-Domäne konzentrieren und daher nur wenige Sequenzen der Primer-Domäne aus behandelten HBV-Patienten vorliegen. Daher ist es durchaus möglich, dass diese Mutation noch bei weiteren Patienten gefunden werden kann, wenn man bei der Sequenzierung die Primer-Domäne mit einschließen würde.

Da bisher kein 3D-Modell der Primer-Domäne in der HBV-Polymerase vorliegt, ist es nicht möglich zu sagen, welche Auswirkungen diese Mutation auf die Tertiärstruktur der Polymerase hat und wodurch das verminderte Ansprechen auf die NA Adefovir und Tenofovir bewirkt wird. Aufgrund der Ähnlichkeit der HBV-Polymerase zu der des HIV sind die bisherigen Erkenntnisse zur Raumstruktur der HIV RT-Domäne auf das HBV mit einer gewissen Berechtigung übertragen worden. Es existieren bei HIV jedoch außerhalb der RT-Domäne auch Resistenzmutationen in der RNaseH-Domäne [155]. Der „Priming“-Vorgang, der zur Synthese des entsprechenden minus-DNA-Strangs führt, ist aber bei HIV grundsätzlich anders. Bei HIV bewirkt eine zelluläre Transfer-RNA (t-RNA) das Priming, bei HBV dient innerhalb der viralen Polymerase die Aminosäure Tyrosin der Primerdomäne als Primer für die reverse Transkription (Protein-Priming). Man kann spekulieren, dass die Mutation prT76S die Tertiärstruktur der gesamten Polymerase dahingehend verändert, dass die Inhibitoren während der reversen Transkription von der viralen RT nicht mehr integriert werden können. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Priming der Replikation durch die Mutation prT76S gehemmt wird. Dabei werden normalerweise durch die Reverse

Transkriptase an die Hydroxylgruppe des Tyrosins der Position 63 vier Nukleotide angehängt (TGAA) [156]. Möglicherweise kommt es durch die Mutation prT76S zu einer Konformationsänderung und damit zu einem bevorzugten Einbau des natürlichen Substrats im Gegensatz zu den NA Adefovir und Tenofovir.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Resistenzprofile der in Huh7- und HepG2-Zellen phänotypisch untersuchten HBV-Klone. Dargestellt sind der Wildtyp, das Patientenisolat 150-1 und verschiedene Klone, die mit Adefovir und Tenofovir inhibiert wurden. Der Resistenzfaktor (RF₅₀) bezieht sich auf den Wildtyp, wohingegen die Signifikanz (Sig.) im Vergleich zu dem Klon 150-1 berechnet wurde. Huh7-Zellen: nicht signifikant (ns): $p > 2,6 \times 10^{-3}$, *: $p < 2,6 \times 10^{-3}$, **: $p < 5,3 \times 10^{-4}$, ***: $p < 5,3 \times 10^{-5}$. HepG2-Zellen: Nach der Inhibition mit Adefovir: nicht signifikant (ns): $p > 5 \times 10^{-3}$, *: $p < 5 \times 10^{-3}$, **: $p < 1 \times 10^{-3}$, ***: $p < 1 \times 10^{-4}$. Nach der Inhibition mit Tenofovir: nicht signifikant (ns): $p > 3,3 \times 10^{-3}$, *: $p < 3,3 \times 10^{-3}$, **: $p < 6,7 \times 10^{-4}$, ***: $p < 6,7 \times 10^{-5}$. grün: keine Resistenz im Vergleich zum Wildtyp; gelb: leicht erhöhte Resistenz (für Adefovir: RF 2 bis 15, für Tenofovir: RF 2 bis 10); rot: deutlich erhöhte Resistenz (für Adefovir: RF > 15, für Tenofovir: RF > 10); nb: nicht bestimmt.

Mutante	Huh7-Zellen		HepG2-Zellen			
	Tenofovir		Tenofovir		Adefovir	
	RF ₅₀	Sig.	RF ₅₀	Sig.	RF ₅₀	Sig.
[1] Wildtyp	1	***	1	***	1	***
[2] 150-1	20,4		18,5		86,4	
[3] Muc38	3,1	***	2,8	***	7,2	***
[4] WT +150-1(Pr;Sp)	1,7	***	nb	nb	nb	nb
[5] WT + 150-1(RH)	0,8	***	nb	nb	nb	nb
[6] Muc38 + 150-1(RH)	2,5	***	nb	nb	nb	nb
[7] 150-1 + WT(RH)	17,2	ns	nb	nb	nb	nb
[8] Muc38 +150-1(Pr;Sp)	9,4	ns	nb	nb	nb	nb
[9] 150-1(Pr_N73H,S76T,E90K)	7	***	6,6	*	nb	nb
[10] 150-1(Pr_N118K)	27,6	ns	nb	nb	nb	nb
[11] 150-1(Pr_R164H)	16,7	ns	nb	nb	nb	nb
[12] 150-1(Pr_K178D)	38,8	ns	nb	nb	nb	nb
[13] WT + 150-1(RT)	7,3	*	3,7	**	13,1	*
[14] WT(Pr_H73N,T76S,K90E) + 150-1(RT)	15,6	ns	23,6	ns	nb	nb
[16] 150-1(Pr_N73H)	15,8	ns	36,6	ns	37,3	ns
[17] 150-1(Pr_S76T)	nb	nb	3,5	***	10,3	**
[18] 150-1(Pr_E90K)	nb	nb	16,4	ns	66,4	ns
[19] Muc38(Pr_T76S)	nb	nb	15,4	ns	35,9	ns
[20] WT(Pr_T76S) + 150-1(RT)	nb	nb	33,3	ns	103,1	ns

Verlauf der Therapie des Patienten 150

Der Patient, aus dem der Klon 150-1 isoliert wurde, zeigte nach der fehlgeschlagenen Adefovir-Therapie ein außergewöhnlich langsames und unvollständiges Ansprechen auf die Tenofovir-Therapie. Dies konnte bei anderen Patienten bereits beobachtet werden [111]. Der Klon 150-1 hat sich bei der weiteren Behandlung des Patienten nicht durchgesetzt [154]. Man kann davon ausgehen, dass andere Klone im Vergleich dazu eine bessere Fitness

aufwiesen und dadurch bei der Selektion berücksichtigt wurden. Das müsste in weiteren Versuchen untersucht werden.

Unter einer erfolgreichen Therapie kann die die Virus-Konzentration unter die Nachweisgrenze absinken. In den Kernen der Hepatozyten kann man dann jedoch immer noch die cccDNA finden. Als Kontrolle für einen nachhaltigen Therapieerfolg, der auch Absetzen der Therapie weiterbesteht wird daher die HBsAg-Konzentration im Blut gemessen. Das HBsAg steht dabei indirekt für die Menge der transkribierten mRNA und somit für die Menge der expressionsfähigen cccDNA. Um den Verlauf der HBV-Infektion des Patienten zu untersuchen, aus dem der Klon 150-1 isoliert wurde, wurde die HBsAg-Konzentration während des gesamten Krankheitsverlaufs regelmäßig ermittelt (Abbildung 12). Die HBsAg-Konzentration stieg dabei bis etwa 10 Monate nach Start der Tenofovirgabe an, was bestätigt, dass die NA nur die reverse Transkription und die reifungdabhängige Sekretion der HBV-Partikel hemmen, der cccDNA-Pool aber weiter besteht und sogar noch verstärkt exprimiert werden kann. Im späteren Verlauf der Therapie sank HBsAg sehr langsam wieder ab und erreichte Werte etwas unterhalb des Ausgangswerts. Dies deutet auf eine nur geringe Abnahme der cccDNA hin und auf die Notwendigkeit, die Therapie womöglich lebenslang fortsetzen zu müssen.

5.2 Untersuchung des Therapieverlaufs chronisch infizierter Woodchucks durch den Nachweis von WHsAg

Wie aus dem vorherigem Kapitel deutlich wurde, führt eine Behandlung der chronischen Hepatitis B mit oral applizierten Inhibitoren der HBV reversen Transkriptase, wie z.B. Tenofovir, zwar zur Senkung der Viruslast der betroffenen Patienten, nicht jedoch zur Ausheilung, die sich klinisch generell durch den Verlust des HBsAg und das Auftreten von neutralisierenden Antikörpern gegen das Virus (anti-HBs Serokonversion) zeigt. Jüngste Untersuchungen legen nahe, dass ein aktiviertes Immunsystem hierbei eine entscheidende Rolle spielt, da nur hierdurch HBV-infizierte Hepatozyten eliminiert werden können [157]. In welcher Weise eine Aktivierung des Immunsystems gerade bei der chronischen Hepatitis B zu erfolgen hat, und wie es HBV schafft, diese Immunreaktion zu unterdrücken, ist noch immer nicht ausreichend bekannt.

Um verschiedene experimentelle Therapien zur Aktivierung des Immunsystems bei der chronischen Hepatitis B testen zu können, bedient man sich hauptsächlich des mit dem Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV) infizierten Nordamerikanischen Walddarmeltiers (Woodchuck). WHV-infizierte Woodchucks sind ein wichtiges und anerkanntes Tiermodell zur Untersuchung der chronischen Hepatitis B. Nicht zuletzt aufgrund des zum Menschen

vergleichbaren Infektionsverlaufs und der ähnlichen Immunantwort dient dieses Modell häufig zur Untersuchung neuer Therapiemöglichkeiten und zur Erforschung verschiedener Immunmechanismen in Bezug zur Hepatitis B. In zwei Studien wurden hier anhand des Woodchuck-Modells neue innovative Therapiemöglichkeiten experimentell begleitet, die auf lange Sicht möglicherweise auch zur Behandlung der Hepatitis B des Menschen eingesetzt werden könnten.

5.2.1 Verlauf der WHsAg-Konzentration in chronisch infizierten Woodchucks nach der Behandlung mit DNA-Vakzinen

In dieser ersten Studie sollte in Zusammenarbeit mit der AG Roggendorf, Universitätsklinikum Essen der Erfolg einer Therapie von chronisch mit WHV infizierten Woodchucks mit einer Kombination aus dem Nukleosid-Analogon Entecavir und einer DNA-Vakzine untersucht werden [145]. In Verlaufsproben der Tiere wurde in dieser Arbeit die WHsAg-Konzentration mittels Laurell-Elektrophorese in allen Proben quantifiziert und mit weiteren klinischen Messparametern der AG Roggendorf verglichen [145]. Bei allen mit Entecavir behandelten Tieren zeigte sich erwartungsgemäß unter Therapie eine Abnahme der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze (Abbildung 28), während die WHsAg-Abnahme insgesamt langsamer verlief. Dies ist nicht verwunderlich, da Entecavir die Replikation des Virus auf der Ebene der viralen Genomreifung inhibiert, nicht jedoch die Transkription der mRNAs und die Translation von viralen Proteinen, wie z.B. der viralen Oberflächenproteine (in diesem Fall das WHsAg). Allerdings zeigten nur zwei mit der Kombinationstherapie (Entecavir und DNA-Vakzine) behandelten Tiere eine effektive Kontrolle der Viruslast (WHV-DNA im Serum negativ) auch nach dem Absetzen von Entecavir. Bei dem Kontroll-Tier, das nur mit Entecavir behandelt wurde, zeigte sich einige Wochen nach dem Stopp der Entecavir-Gabe wieder eine Viruslast im Serum des Tieres, die zum Ende der Untersuchung wieder auf Konzentration zu Beginn der Therapie anstieg. Dagegen führte die Kombinationstherapie (bei Tier 61792 und 61793) zur Ausbildung von anti-WHs und zur Ausbildung von WHcAg und WHsAg-spezifischen CD4- und CD8-positiven T-Zellantworten in behandelten Woodchucks [145]. Zusätzlich dazu konnte bei dem Tier 61792 gezeigt werden, dass das WHsAg nach 52 Wochen vollständig verschwunden war und auch mehrere Wochen nach Ende der Therapie nicht mehr nachzuweisen war. Daraus kann man schließen, dass dies sehr wahrscheinlich auf die Elimination der WHV-infizierten Hepatozyten durch Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen zurückzuführen ist. Da das Tier 61793 aufgrund einer bakteriellen Infektion frühzeitig euthanisiert werden musste, konnte das Tier nicht über den gleichen Zeitraum beobachtet werden. Bei der anschließenden Untersuchung der Leber konnte von den Kollegen in Essen immer noch WHV-DNA in den

Zellen nachgewiesen werden, die für die Synthese und Anwesenheit des WHsAg im Serum der Tiere verantwortlich war. Allerdings war auch bei diesem Tier im Blut kein Virus (WHV-DNA) mehr nachweisbar und die WHsAg-Konzentration sank während des gesamten Verlaufs stetig. Zusammen mit der Anwesenheit der anti-WHs-Antikörper, kann man davon ausgehen, dass auch hier eine Kontrolle der WHV-Infektion erreicht wurde. Dies beobachtet man auch bei der ausheilenden, akuten Hepatitis B des Menschen. Hier konnte trotz des Vorhandenseins von anti-HBs-Antikörpern eine HBV-DNA-Replikation in der Leber nachgewiesen werden. Bei diesen Patienten verhindert jedoch die hohe anti-HBs-Antikörper-Konzentration durch effektive Neutralisation eventuell noch vorhandener Viren eine Neuinfektion der Leberzellen [158],[159].

In einer vorangegangenen Studie an Vögeln (Enten) konnte gezeigt werden, dass eine Therapie aus Entecavir und einer DNA-Vakzinierung gegen Core-Proteine und der Oberflächenantigene des Enten- („duck“) Hepatitis-B-Virus (DHBV) die Chronifizierung einer DHBV-Infektion bei Enten verhindern konnte [160]. Für Säugetiere konnte dann nachgewiesen werden, dass die WHV spezifische T-Zellantwort durch eine Kombinationstherapie aus NA und DNA-Vakzinierung in chronisch infizierten Woodchucks wiederhergestellt werden kann [161] [137]. Die Ergebnisse an Enten konnten in dieser Studie auch für Säugetiere (Woodchucks) bestätigt werden. Hier war es möglich, durch ein therapeutisches T-Zell-Vakzin in Kombination mit Entecavir eine WHsAg- und WHcAg-spezifische T-Zellantwort zu stimulieren, die in dem Kontrolltier (nur mit Entecavir behandelt) nicht nachweisbar war.

5.2.2 Verlauf der WHsAg-Konzentration in chronisch infizierten Woodchucks nach einer experimentellen Therapie mit einer DNA-Vakzine und anti-PD-L1-Antikörpern

In einer weiteren Studie sollte in Zusammenarbeit mit der AG Roggendorf, Universitätsklinikum Essen die Auswirkung einer experimentellen Kombinationstherapie aus Entecavir, einem DNA-Vakzin und einem spezifischen anti-PD-L1 Antikörper auf den Verlauf chronisch WHV-infizierter Woodchucks untersucht werden [146]. Von früheren Untersuchungen war bekannt, dass in den frühen Phasen einer akuten HBV-Infektion die PD-1 Expression auf HBV-spezifischen CD8-positiven T-Zellen gesteigert ist [162]. Bei PD-1 handelt es sich um einen Rezeptor, der den programmierten Zelltod von T-Zellen auslöst und dessen Expression bei HBV-Patienten häufig erhöht ist, wodurch die Virus-spezifische T-Zellantwort während einer HBV-Infektion nachlässt [163], was dann zur Chronifizierung der HBV-Infektion führen kann. Wie in der oben genannten Studie gezeigt werden konnte, bewirkt eine Kombinationstherapie aus Entecavir und DNA-Vakzinierung eine Abnahme der

WHV- und der WHsAg-Konzentration in chronisch WHV-infizierten Woodchucks [145]. Versuche, chronische HBV-Patienten mit dem üblichen Hepatitis B Impfstoff mit [150] oder ohne [151] Interferon zu therapieren waren erfolglos [151]. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Viruslast im Serum der Patienten (HBV-DNA-Konzentration) bei der experimentellen Vakzinierung zu hoch war [164]. Um die Viruslast vor der experimentellen Impfung im Woodchuck-System zu senken, wurde den chronisch infizierten Tieren in dieser Studie über mehrere Wochen das hochwirksame Nukleosid-Analogon Entecavir verabreicht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Entecavir alleine schon eine Verringerung der PD-1-Expression auf T-Zellen bewirkte [146]. Dies führte jedoch nicht zu einer nachhaltigen Viruskontrolle durch das Immunsystem der Tiere, da die Viruslast und die WHsAg-Menge im Serum nach der Entecavir-Gabe wieder zunahm [146]. Erst die Kombinationstherapie aus Entecavir, DNA-Vakzinierung und PD-L1 Antikörpern konnte die WHV-spezifische T-Zellantwort insgesamt steigern und die WHV-DNA-Konzentration im Plasma/Serum der Woodchucks senken [146]. Allerdings konnte bei einigen Woodchucks in der Leber immer noch eine geringe Replikation des WHV nachgewiesen werden [146]. Die in dieser Arbeit getesteten Seren der Woodchucks (70102, 70104 und 70108) erhielten alle die Kombinationstherapie aus Entecavir, DNA-Vakzinierung und anti-PD-L1 Antikörper. Die Ergebnisse der WHsAg-Bestimmung zeigte bei der Gruppe mit der Dreifach-Therapie während des Therapieverlaufs einen Abfall der WHsAg-Konzentration. Jedoch zeigte nur ein Tier (70108) einen dauerhaften Verlust des WHsAg auch nach bis zu 44 Wochen (Abbildung 30). Die anderen Woodchucks zeigten nach der Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert entweder eine leichte Verringerung (Tier 70104) oder sogar einen gesteigerten WHsAg-Wert (Tier 70102).

Zusammenfassend führt eine Behandlung mit Entecavir, DNA-Vakzinierung und anti-PD-L1 Antikörpern im Woodchuck-Model zur Stimulation einer spezifischen und anhaltenden antiviralen T-Zell-Antwort und damit teilweise zur Eliminierung des Virus und des zirkulierenden Antigens. Diese Behandlung könnte auf lange Sicht eine neue Therapiemöglichkeit für die chronische Hepatitis B darstellen.

Bedeutung der experimentellen Behandlungs-Versuche an chronisch WHV-infizierten Woodchucks für die Therapie der chronischen Hepatitis B des Menschen.

Es ist nötig, neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der chronischen Hepatitis B zu entwickeln, da die bislang anerkannten Therapien nicht optimal wirken. Die Behandlung mit Interferon ruft eine Vielzahl an Nebenwirkungen hervor und zeigt nur bei etwa einem Drittel

der Patienten einen nachhaltigen antiviralen Effekt. Die Inhibitoren der viralen reversen Transkriptase (RT) führen nicht zu einer kompletten Entfernung des Virus aus dem Körper, da die virale cccDNA in den Kernen der Hepatozyten verbleibt und die Therapie daher oft lebenslang fortgesetzt werden müsste. Eine starke T-Zellantwort ist wichtig, um eine HBV-Infektion durch das Immunsystem zu kontrollieren, wie dies die Versuche an chronisch WHV-infizierten Woodchucks eindrucksvoll ergeben haben [145]. Die Bedeutung einer starken T-Zell-Antwort in diesem Zusammenhang konnte experimentell auch bereits an Schimpansen gezeigt werden. Hierbei führte eine selektive Depletion der CD8-positiven T-Zellen während einer HBV-Infektion zu einer Chronifizierung der Infektion [165]. Eine mögliche Strategie für eine verbesserte Behandlung der chronischen Hepatitis B des Menschen könnte daher auch mit der Stimulation des Immunsystems über eine therapeutische T-Zell-Vakzine gegeben sein. In einer Studie an drei chronisch HBV-infizierten Schimpansen konnte durch den Einsatz eines rekombinanten, HBcAg-produzierenden Retrovirus bei einem Schimpansen eine starke immunologische Reaktion gegen HBV induziert werden, die zur Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe führte und nachfolgend zur Ausheilung der Infektion [166]. Die Verwendung von Schimpansen als Modellsystem für die chronische Hepatitis B ist jedoch sehr schwierig und ethisch fragwürdig, was eine Evaluation der beschriebenen experimentellen Therapien mit Woodchucks für eine sichere Therapie des Menschen sehr schwierig macht. Hier sollte auch stets bedacht werden, dass der Umgang mit viralen Vektoren und deren Einsatz bei Patienten mit Risiken verbunden ist, die fatale Auswirkungen haben können. Insbesondere die bei den Woodchucks eingesetzten Adenoviren [145] als virale Vektoren haben in der Vergangenheit in einem gentherapeutischen Ansatz zu einem tragischen Todesfall geführt [167]. In der jüngsten Vergangenheit wurde die Virussicherheit der adenoviralen Vektoren im Rahmen von gentherapeutischen Ansätzen weiter verbessert, bzw. weitere virale Vektorsysteme auf der Basis von Lentiviren und Adeno-assoziierten Viren (AAV) mit optimierter Virussicherheit auch am Menschen erfolgreich angewendet (für eine aktuelle Übersicht, siehe: [168]).

Eine verbesserte Strategie zur nachhaltigen Therapie der chronischen Hepatitis B könnte nach den Erfahrungen dieser Arbeit demnach auf mehreren Säulen ruhen:

- 1. Effiziente und rasche Senkung der Viruslast** nach Blockade der viralen Replikation durch spezifische antivirale Nukleos(t)id-Analoga mit hoher genetischer Barriere (z.B. Entecavir und Tenofovir).
- 2. Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort** gegen HBcAg und HBsAg z.B. durch Prime-boost-DNA-Vakzinierungen, die wie im hier beschriebenen Woodchuck-Modell zum Verlust von HBV-infizierten Hepatozyten führt [145]. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass es nicht zur überschießenden Immunantwort kommt, die zu einer fulminanten Hepatitis

mit akutem Leberversagen führen könnte. Deshalb sollte nachfolgend die spezifische T-Zellantwort unbedingt kontrollierbar sein.

3. Regulation und mögliche Kontrolle der antiviralen T-Zell-Antwort, z.B. durch Regulation von inhibitorischen Rezeptoren (z.B. „programmed death receptor-1“, PD-1) auf T-Zellen oder deren Interaktion mit seinen Liganden (PD-1/PD-Ligand) durch zielgerichtete Antikörper, wie im Woodchuck-Modell in dieser Arbeit gezeigt wurde [146].

5.3 Vergleich des SHBs verschiedener Genotypen des WHO-Genotypen-Panels

Wie in dem vorherigen Abschnitt beschrieben stellt das virale Antigen WHsAg und analog dazu auch das HBsAg einen der wichtigsten Biomarker für den langfristigen Therapieerfolg der Hepatitis B unter Nukleos(t)id-Analoga dar [169]. Die HBsAg-Konzentration im Blut eines mit HBV infizierten Patienten kann zusammen mit der HBV-DNA-Konzentration Aufschluss über den Verlauf der Infektion geben [170]. Ein rasches Verschwinden des HBsAg führt normalerweise zu einem besseren klinischen Verlauf der Infektion und im besten Fall zu einer Heilung [171], [172]. Bisher liegt ausschließlich der Genotyp A2 als internationaler Standard vor, der weltweit jedoch nur etwa 1% der HBV-Infektionen ausmacht. Mit diesem Standard werden bisher alle diagnostischen Tests für den Nachweis der akuten und chronischen HBV validiert. Da sich die verschiedenen Genotypen und auch Subgenotypen in ihrer Reaktivität und Nachweisbarkeit unterscheiden, wurde in einer Zusammenarbeit des Instituts für Medizinische Virologie in Gießen mit dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen und der WHO das WHO-Genotypen-Panel etabliert. [17, 141]. Für die Studie wurden 215 Seren von HBV-positiven Patienten gesammelt, die verschiedene Subgenotypen der Genotypen A bis G beinhalteten. Daraus wurden 15 Seren selektiert, die in 16 verschiedenen Laboren mit verschiedenen Tests untersucht wurden. Dadurch sollte ermittelt werden, ob mit unterschiedlichen diagnostischen Tests die verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden können, sodass zukünftige diagnostische Nachweissysteme mit dem gesamten Genotypen-Panel validiert werden können.

Von der aus den Seren des Panels isolierten HBV-DNA wurde in dieser Arbeit jeweils das SHBs-Gen in den Vektor pCEP-Puro einkloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Durch die Selektion mit Puromycin wurden stabile, SHBs-exprimierende Zelllinien hergestellt. Dadurch kann das SHBs des Genotyps im Gegensatz zu den limitierten Seren in großer Menge nach Bedarf neu produziert werden. Das SHBs aus den stabil transfizierten Zellen kann dann als Standard für diagnostische Tests oder auch für die weitere Untersuchung dienen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das in stabilen Zelllinien exprimierte SHBs in

diagnostischen Tests erkannt wird und ob Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen erkennbar sind.

Zunächst wurde untersucht, ob die humane Hepatom-Zelllinie Huh7 und die humane Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa, die stabil mit dem Plasmid für die SHBs Expression transfiziert sind, unterschiedliche Mengen an SHBs produzierten. Es war bei den beiden Zelllinien kein nennenswerter Unterschied in der SHBs-Konzentration zu erkennen. Obwohl es sich bei Huh7 Zellen um Hepatomzelllinien handelt, wurden in den weiteren Versuchen die HeLa-Zellen verwendet, da diese nach der Transfektion des HBs-Expressionsvektors durch Puromycin leichter zu selektieren waren.

In einem weiteren Versuch sollte die richtige FKS-Konzentration für die optimale Expression von SHBs ermittelt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer 10%igen FKS Konzentration die größte Menge an SHBs produziert wird. Da FKS zu einem Wachstum der Zellen führt, kommt es bei Hepatomzelllinien eher zu einer weiteren Dedifferenzierung der Zellen, was sich negativ auf die SHBs-Produktion auswirken könnte [173]. In diesem Fall wurden jedoch HeLa-Zellen verwendet, die durch diese FKS-Konzentration vielleicht ein optimales Wachstum erreichen und dadurch höhere Mengen an SHBs produzieren.

Das in den HeLa-Zellen produzierte SHBs kann sowohl im Immun Assay Architect der Firma Abbott als auch im laboreigenen EIA mit dem Antikörper C20/02 nachgewiesen werden. Der Antikörper C20/02 erkennt konformationell das SHBs (persönliche Mitteilung W. H. Gerlich, Gießen). Es konnte bereits beschrieben werden, dass mit dem Architect alle HBV-Genotypen annähernd gleich gut detektiert werden können [18]. Dies konnte in dieser Arbeit mit diesem System bestätigt werden. Die Erkennung des SHBs des Genotyps F2 ist sogar besser als durch den monoklonalen Antikörper C20/02, der zu einem Zeitpunkt entwickelt wurde, als der 1992 entdeckte HBV-Genotyp F noch gar nicht bekannt war [174]. Ein Unterschied der verschiedenen Genotypen bezüglich der Expression des SHBs lässt sich zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht feststellen. Insgesamt ist die Konzentration des rekombinanten SHBs aus der Zellkultur jedoch deutlich geringer als im Serum (Tabelle 8). Die Menge ist jedoch für die Validierung von neuartigen, hochsensitiven diagnostischen HBsAg-Nachweisverfahren (wie z.B. im HBsAg-Architect-System, der Fa. Abbott) völlig ausreichend. Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich war, mit stabil transfizierten HeLa-Zellen rekombinantes SHBs verschiedener HBV-Genotypen herzustellen, das in der HBsAg-Diagnostik verwendbar ist. Das exprimierte SHBs der unterschiedlichen HBV-Genotypen, könnte als Standard für diagnostische Untersuchungen und Test-Validierungen dienen.

Tabelle 8: Isolate aus Patientenserum des WHO-Genotypenpanels. Die Zuordnung der Genotypen A bis G erfolgte durch das WHO-Genotypenpanel [17]. Zusammengefasst sind die von Chudy *et al.* ermittelten HBV-DNA und HBsAg-Konzentrationen aus den Seren, sowie die in dieser Arbeit mit dem Architect und dem EIA mit dem C20/02 Antikörper gemessenen HBsAg-Konzentrationen der stabilen HBsAg-produzierenden Hela-Zelllinien.

Genotyp	Interne Bezeichnung	Serotyp	HBV-DNA [GE/ml] <i>Chudy et al. 2012</i>	HBsAg [IU/ml] (Architect) <i>Chudy et al. 2012</i>	HBsAg [IU/ml] (Architect)	HBsAg [ng/ml] (ELISA, C20/02)
A1	N4542	adw2	$1,6 \times 10^{10}$	131.900	36,44	27,37
A2	N4879	adw2	$3,4 \times 10^9$	74.300	11,38	9,58
B1	N4214	adw2	$5,3 \times 10^8$	51.400	10,01	9,14
B2	N4222	adw2	$8,9 \times 10^8$	95.300	3,49	4,32
C2	N4227	adr	$2,0 \times 10^9$	70.200	5,97	6,90
D1	N4203	ayw2	$4,2 \times 10^9$	130.400	4,36	7,13
D3	N4595	ayw2	6×10^8	63.800	1,07	1,21
F3	N4494	adw4	$1,6 \times 10^7$	32.200	8,27	0,95
G	V1659	adw2	$1,4 \times 10^7$	900	3,71	2,86

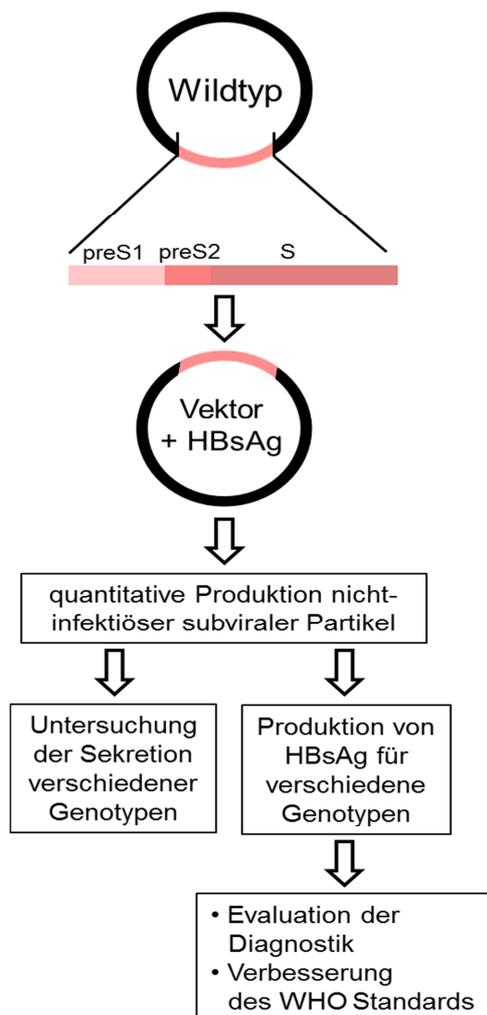


Abbildung 34: Untersuchung subviraler Partikel. Die Produktion und Untersuchung rekombinanter subviraler Partikel bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Verbesserung diagnostischer Tests.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Produktion rekombinanter subviraler Partikel viele Möglichkeiten zur Verbesserung diagnostischer Tests bietet (Abbildung 34). Mit stabil transfizierten Zelllinien kann SHBs verschiedener Genotypen in großen Mengen hergestellt werden, welches unter anderem als Standard eingesetzt werden kann. Zudem kann dessen Sekretion, sowie die Reaktivität in diagnostischen Tests verglichen werden. Dadurch können dann verschiedene diagnostische Nachweismethoden, insbesondere neu auf den Markt kommende Produkte von den Aufsichtsorganen und den Anwendern evaluiert werden. Auch für immunologische Untersuchungen können die Proben nützlich sein, wenn es darum geht Gruppen-spezifische von Genotyp-spezifischen HBsAg-Epitopen zu unterscheiden.

6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals eine sekundäre Resistenzmutation gegen Adefovir und Tenofovir identifiziert werden, die sich außerhalb der RT-Domäne der HBV Polymerase befindet. Zukünftig wird es daher notwendig sein, bei der genotypischen und phänotypischen Analyse von Resistenzmutationen auch die Primer-Domäne mit einzubeziehen. Damit könnten eventuell viele ungeklärte antivirale Resistenzphänomene erklärt werden.

Da sich eine Behandlung mit Nukleos(t)id-Analoga auf die Inhibition der viralen Replikation beschränkt, kommt es dabei in den meisten Fällen nicht zu einer vollständigen Ausheilung der Hepatitis B. Ein großer Fortschritt in der Therapie der chronischen Hepatitis B könnte daher eine nachhaltige Stimulation des Immunsystems sein, die auch unabhängig von einer unspezifisch wirkenden Interferon-Gabe, z.B. durch Vakzinierung gegen virale T-Zell-Epitope erreicht werden könnte. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass chronisch WHV-infizierte Woodchucks auf die Gabe von Entecavir, DNA-Vakzinierung und PD-L1 Antikörper in einigen Fällen mit dem Verlust des WHsAg auch nach Therapie-Ende reagierten, sollte im nächsten Schritt versucht werden, dieses System auf die Behandlung von Menschen anzupassen. Mit dieser Therapie könnte eine gezielte Aktivierung des Immunsystems HBV-infizierter Patienten erreicht werden.

Die Bedeutung der Quantifizierung des HBsAg als Biomarker während der antiviralen Therapie der chronischen Hepatitis B wird weiter zunehmen. Da die Menge an HBsAg im Serum der Patienten mit der HBV cccDNA in infizierten Hepatozyten der Patienten weitgehend korreliert, kann mittlerweile auch ohne Leber-Biopsie der Therapie-Erfolg durch eine simple Blutentnahme indirekt quantifiziert werden. Dadurch können Patienten individueller und effektiver antiviral behandelt werden. Voraussetzung hierfür ist eine exakte Quantifizierung des HBsAg über die unterschiedlichen HBV-Genotypen und HBsAg Subtypen hinweg. Mit dem in dieser Arbeit erarbeiteten stabilen HBsAg-Produktionssystem relevanter HBV-Genotypen auf der Basis von eukaryoten Zell-Linien steht nun ein Standardpanel zur Validierung der *in vitro* HBsAg-Diagnostik zur Verfügung, das unabhängig gegenüber den Limitationen einzelner Serumproben von HBV-Patienten ist. Hier können gezielt und schnell durch Klonierung der entsprechenden viralen Varianten der Einfluss von neuen HBV-Genotypen und speziellen Resistenz- oder Immun-*Escape*- Mutationen auf die Reaktivität der einzelnen (kommerziellen) diagnostische Testsysteme evaluiert werden.

7. Zusammenfassung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) verursacht eine der häufigsten Viruserkrankungen weltweit. Unbehandelt führt die aktive chronische Hepatitis B fast immer zu ernststen Leberschädigungen, wie Leberfibrose oder -Zirrhose, mit fatalen Folgen, wie dem hepatozellulären Karzinom. In dieser Arbeit wurde ein zuvor beschriebenes HBV-Isolat (150-1) aus einem Patienten mit chronischer Hepatitis B weiter analysiert, das gegen die Nukleotidanaloga Adefovir und Tenofovir auffällig hohe Resistenzen *in vitro* zeigte. Bei diesem Isolat 150-1 konnte in dieser Arbeit in der Primerdomäne der HBV-Polymerase die Mutation prT76S ermittelt werden, die als Sekundärmutation zusammen mit den Primärmutationen in der Reversen Transkriptase (rtA181V und rtN236T) für die auffällig hohe Resistenz des Klons gegen Tenofovir und Adefovir verantwortlich ist. Hierbei wurde erstmalig eine Resistenzmutation gegen NA beschrieben, die sich in der Primer-Domäne der viralen Polymerase und damit außerhalb der Reversen Transkriptase befindet.

Unabhängig davon wurden in zwei Studien in Zusammenarbeit mit der AG Roggendorf, Universitätsklinikum Essen, Therapieverläufe chronisch WHV-infizierter Woodchucks als Surrogat-Tiermodell für die Hepatitis B des Menschen untersucht. Diese wurden in einer ersten Studie mit Entecavir und einer DNA-(„prime-boost“)-Vakzinierung zur Stimulation von T-Zellen gegen T-Zell-Epitope des WHsAg und WHcAg therapiert. In der zweiten Studie wurden zusätzlich zu der Behandlung mit Entecavir und der DNA-Vakzinierung, spezifische Antikörper gegen den Liganden (PD-L1) eines „Selbstmord“-Rezeptors (PD-1-Rezeptor) auf T-Zellen verabreicht, die einen Verlust („Erschöpfung“) der relevanten T-Zell-Population verhindern sollten. In dieser Arbeit wurde der Therapieerfolg, vergleichbar zur HBV-Therapie, anhand der WHsAg-Konzentration im Blut der Woodchucks mittels Laurell-Elektrophorese ermittelt. Die spezifische antivirale Immunreaktion bei den infizierten Woodchucks konnte durch die oben genannten Behandlungen stimuliert werden und führte bei einigen Tieren zu einem völligen Verschwinden des WHsAg auch nach Beendigung der Therapie. Unter Einbeziehung weiterer klinischer Parameter kann in diesen Fällen von einer Heilung der chronischen Hepatitis B im Tiermodell bei Woodchucks ausgegangen werden. Diesen Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der HBsAg-Bestimmung für die Therapie-Überwachung der chronischen Hepatitis. Daher wurden stabile, eukaryote Zelllinien zur HBsAg-Produktion des WHO-Genotypen-Panels hergestellt, wodurch es nun möglich ist *in vitro* rekombinantes HBsAg in nahezu unlimitierten Mengen zu exprimieren, das nachweislich im eigenen HBsAg-Testsystem, wie auch mit einem kommerziellen diagnostischen Test, wie dem qHBsAg-Test im System „Architect“, (Abbott), reagierte. Mit diesem Panel können die Limitationen des WHO-Serum-Panels (limitierte Verfügbarkeit, Infektiosität, Heterogenität von humanen Serum-Proben) verbessert werden und neu auftretende, schlecht nachweisbare HBV-Varianten schneller integriert werden.

8. Summary

The hepatitis B virus (HBV) causes one of the most common virus diseases worldwide. An untreated active chronic hepatitis B often leads to liver fibrosis or cirrhosis with fatal consequences, e.g. development of hepatocellular carcinoma (HCC). The goal of this thesis was to further analyze the previously described cloned HBV isolate 150-1 from a patient with chronic hepatitis B that shows noticeable high resistances against the nucleotide analogues Adefovir and Tenofovir in vitro. In this thesis it could be shown that the mutation prT76S in the primer domain of the HBV polymerase of the isolate 150-1 works as a secondary mutation together with the primary mutations within the reverse transcriptase (rtA181V and rtN236T) and is responsible for the extraordinary resistance of this clone against Tenofovir and Adefovir. Thereby for the first time a resistance mutation against NA was described that lies in the primer domain of the viral polymerase and therefore outside the reverse transcriptase.

Besides that, two studies were performed together with the AG Roggendorf, University Medical Center Essen, to investigate experimental therapies in woodchucks chronically infected with the related woodchuck hepatitis virus (WHV) as a surrogate model for human hepatitis B. In the first study the woodchucks were treated with the NA Entecavir and a DNA- ('prime-boost') vaccination for the stimulation of T cells against T cell epitopes of the WHV surface (WHsAg) and core (WHcAg) antigen. In the second study additionally to the treatment with Entecavir and the DNA vaccination specific antibodies against the ligand (PD-L1) of a 'suicidal' receptor (PD-1-Receptor) on T cells were given that should prevent the exhaustion of the relevant T cell population. In this thesis, success of therapy was determined by quantification of the surface antigen concentration in the blood, comparable to HBV therapy using Laurell electrophoresis. Specific antiviral immune reaction in the infected woodchucks could be stimulated by the above-named treatment with total disappearance of the WHsAg in some animals even after stop of treatment. With the inclusion of further clinical parameters, healing of chronic hepatitis B in the woodchuck model could be achieved, at least in some cases.

These results underline importance of HBsAg determination for therapy control of chronic hepatitis B. Thus, the establishment of stable eukaryotic cell lines for HBsAg expression of the WHO HBV genotype panel allows production of recombinant SHBs in vitro in nearly unlimited amounts, which reacted similarly in "in-house tests" and commercial quantitative diagnostic tests for HBsAg (Abbott Architect). With this panel the limitations of the WHO serum panel (like limited availability, infectivity, heterogeneity of human plasma samples) could be improved and adapted to emerging HBV variants in the future.

9. Literaturverzeichnis

1. Blumberg, B.S., Alter, H.J., and Visnich, S., A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA*, 1965. **191**: p. 541-6.
2. Blumberg, B.S., Gerstley, B.J., Hungerford, D.A., London, W.T., and Sutnick, A.I., A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 1967. **66**(5): p. 924-31.
3. Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M., Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
4. Almeida, J.D., Rubenstein, D., and Stott, E.J., New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*, 1971. **2**(7736): p. 1225-7.
5. Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Robinson, W.S., DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*, 1973. **12**(5): p. 995-1005.
6. Robinson, W.S. and Greenman, R.L., DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 1974. **13**(6): p. 1231-6.
7. Robinson, W.S., Clayton, D.A., and Greenman, R.L., DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 1974. **14**(2): p. 384-91.
8. Hu, W.G., Wei, J., Xia, H.C., Yang, X.X., Li, F., Li, G.D., Wang, Y., and Zhang, Z.C., Identification of the immunogenic domains in HBsAg preS1 region using overlapping preS1 fragment fusion proteins. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(14): p. 2088-94.
9. King, A., *Virus Taxonomy - IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2011, Elsevier LTD, Oxford.
10. Drexler, J.F., Geipel, A., Konig, A., Corman, V.M., van Riel, D., Leijten, L.M., Bremer, C.M., Rasche, A., Cottontail, V.M., Maganga, G.D., Schlegel, M., Muller, M.A., Adam, A., Klose, S.M., Carneiro, A.J., Stocker, A., Franke, C.R., Gloza-Rausch, F., Geyer, J., Annan, A., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S., Binger, T., Vallo, P., Tschapka, M., Ulrich, R.G., Gerlich, W.H., Leroy, E., Kuiken, T., Glebe, D., and Drosten, C., Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(40): p. 16151-6.
11. He, B., Fan, Q., Yang, F., Hu, T., Qiu, W., Feng, Y., Li, Z., Li, Y., Zhang, F., Guo, H., Zou, X., and Tu, C., Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg Infect Dis*, 2013. **19**(4): p. 638-40.
12. Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., and Magnius, L.O., Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004. **47**(6): p. 289-309.
13. Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M.C., Nogueira, R., Stram, D.O., and Kew, M.C., Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*, 2008. **80**(1): p. 27-46.
14. Locarnini, S., Littlejohn, M., Aziz, M.N., and Yuen, L., Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(6 Pt B): p. 561-75.
15. Yu, H., Yuan, Q., Ge, S.X., Wang, H.Y., Zhang, Y.L., Chen, Q.R., Zhang, J., Chen, P.J., and Xia, N.S., Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9297.
16. Schäfer, S., Glebe, D., and Gerlich, W.H., *Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae) Medizinische Virologie* 2ed. 2010, Thieme, Stuttgart.
17. Chudy, M., Hanschmann, K.M., Kress, J., Nick, S., Campos, R., Wend, U., Gerlich, W., and Nübling, C.M., First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A-G for assays of the viral DNA. *J Clin Virol*, 2012. **55**(4): p. 303-9.
18. Chudy, M., Scheiblauer, H., Hanschmann, K.M., Kress, J., Nick, S., Wend, U., Schuttler, C., Nubling, C.M., and Gerlich, W.H., Performance of hepatitis B surface antigen tests with the first WHO international hepatitis B virus genotype reference panel. *J Clin Virol*, 2013. **58**(1): p. 47-53.

19. Ganem, D., *Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles*. Curr Top Microbiol Immunol, 1991. **168**: p. 61-83.
20. Glebe, D. and Urban, S., *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 22-38.
21. Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R., and Gerlich, W.H., *Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 7): p. 2045-53.
22. Krone, B., Lenz, A., Heermann, K.H., Seifer, M., Lu, X.Y., and Gerlich, W.H., *Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin*. Hepatology, 1990. **11**(6): p. 1050-6.
23. Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W.H., *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence*. J Virol, 1984. **52**(2): p. 396-402.
24. Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R., and Gerlich, W.H., *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein*. EMBO J, 1994. **13**(10): p. 2273-9.
25. Lambert, C. and Prange, R., *Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5199-204.
26. Glebe, D. and Bremer, C.M., *The molecular virology of hepatitis B virus*. Semin Liver Dis, 2013. **33**(2): p. 103-12.
27. Zhou, S. and Standing, D.N., *Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10046-50.
28. Nassal, M., *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, 1992. **66**(7): p. 4107-16.
29. Gerlich, W.H. and Robinson, W.S., *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. Cell, 1980. **21**(3): p. 801-9.
30. Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M., and Schaller, H., *The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5324-32.
31. Radziwill, G., Tucker, W., and Schaller, H., *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 613-20.
32. Summers, J., O'Connell, A., and Millman, I., *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4597-601.
33. Hruska, J.F., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L., and Robinson, W.S., *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **21**(2): p. 666-72.
34. Landers, T.A., Greenberg, H.B., and Robinson, W.S., *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **23**(2): p. 368-76.
35. Seeger, C., Ganem, D., and Varmus, H.E., *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy*. Science, 1986. **232**(4749): p. 477-84.
36. Bartenschlager, R. and Schaller, H., *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription*. EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4185-92.
37. Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R., and Schaller, H., *Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2994-9.
38. Sattler, F. and Robinson, W.S., *Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends*. J Virol, 1979. **32**(1): p. 226-33.
39. Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Buscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., and Schaller, H., *Replication strategy of human hepatitis B virus*. J Virol, 1987. **61**(3): p. 904-11.

40. Tiollais, P., Pourcel, C., and Dejean, A., *The hepatitis B virus*. Nature, 1985. **317**(6037): p. 489-95.
41. Ganem, D. and Varmus, H.E., *The molecular biology of the hepatitis B viruses*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 651-93.
42. Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U., *Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 996-1003.
43. Tang, H., Banks, K.E., Anderson, A.L., and McLachlan, A., *Hepatitis B virus transcription and replication*. Drug News Perspect, 2001. **14**(6): p. 325-34.
44. Tur-Kaspa, R., Shaul, Y., Moore, D.D., Burk, R.D., Okret, S., Poellinger, L., and Shafritz, D.A., *The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer*. Virology, 1988. **167**(2): p. 630-3.
45. Park, G.T., Yi, Y.W., Choi, C.Y., and Rho, H.M., *A negative regulatory element and its binding protein in the upstream of enhancer II of hepatitis B virus*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(12): p. 1459-65.
46. Siddiqui, A., Sattler, F., and Robinson, W.S., *Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4664-8.
47. Huang, J. and Liang, T.J., *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, 1993. **13**(12): p. 7476-86.
48. Laskus, T., Rakela, J., and Persing, D.H., *The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants*. Virology, 1994. **200**(2): p. 809-12.
49. Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, L.J., Varmus, H.E., and Ganem, D., *Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription*. Nature, 1990. **344**(6266): p. 552-5.
50. Ryu, D.K., Ahn, B.Y., and Ryu, W.S., *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, 2010. **406**(1): p. 56-64.
51. Schulze, A., Gripon, P., and Urban, S., *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1759-68.
52. Sureau, C. and Salisse, J., *A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant*. Hepatology, 2013. **57**(3): p. 985-94.
53. Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., and Li, W., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. Elife, 2012. **1**: p. e00049.
54. Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., and Kann, M., *Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9849-54.
55. Kock, J. and Schlicht, H.J., *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4867-74.
56. Bock, C.T., Schranz, P., Schroder, C.H., and Zentgraf, H., *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell*. Virus Genes, 1994. **8**(3): p. 215-29.
57. Rall, L.B., Standring, D.N., Laub, O., and Rutter, W.J., *Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(10): p. 1766-73.
58. Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., and Schaller, H., *A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA*. EMBO J, 1990. **9**(10): p. 3389-96.

59. Summers, J. and Mason, W.S., *Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate*. Cell, 1982. **29**(2): p. 403-15.
60. Tuttleman, J.S., Pugh, J.C., and Summers, J.W., *In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus*. J Virol, 1986. **58**(1): p. 17-25.
61. Lambert, C., Doring, T., and Prange, R., *Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9050-60.
62. Huovila, A.P., Eder, A.M., and Fuller, S.D., *Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1305-20.
63. Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., *Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3842-51.
64. Lavanchy, D., *Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention*. J Clin Virol, 2005. **34 Suppl 1**: p. S1-3.
65. WHO, W.H.O., *Hepatitis B - Fact sheet N°204*, 2013: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>.
66. EASL, E.A.F.T.S.O.T., Liver, *EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2012. **57**(1): p. 167-85.
67. Thierfelder, W., Hellenbrand, W., Meisel, H., Schreier, E., and Dortschy, R., *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, 2001. **17**(5): p. 429-35.
68. Lavanchy, D., *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures*. J Viral Hepat, 2004. **11**(2): p. 97-107.
69. Hourfar, M.K., Jork, C., Schottstedt, V., Weber-Schehl, M., Brixner, V., Busch, M.P., Geusendam, G., Gubbe, K., Mahnhardt, C., Mayr-Wohlfart, U., Pichl, L., Roth, W.K., Schmidt, M., Seifried, E., Wright, D.J., and Grp, G.R.C.N.S., *Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus*. Transfusion, 2008. **48**(8): p. 1558-1566.
70. Dienstag, J.L., Werner, B.G., Polk, B.F., Snyderman, D.R., Craven, D.E., Platt, R., Crumpacker, C.S., Ouellet-Hellstrom, R., and Grady, G.F., *Hepatitis B vaccine in health care personnel: safety, immunogenicity, and indicators of efficacy*. Ann Intern Med, 1984. **101**(1): p. 34-40.
71. Ganem, D. and Prince, A.M., *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1118-29.
72. Niederau, C., Heintges, T., Lange, S., Goldmann, G., Niederau, C.M., Mohr, L., and Haussinger, D., *Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B*. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1422-7.
73. Chisari, F.V. and Ferrari, C., *Hepatitis B virus immunopathogenesis*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 29-60.
74. Raimondo, G., Allain, J.P., Brunetto, M.R., Buendia, M.A., Chen, D.S., Colombo, M., Craxi, A., Donato, F., Ferrari, C., Gaeta, G.B., Gerlich, W.H., Levrero, M., Locarnini, S., Michalak, T., Mondelli, M.U., Pawlotsky, J.M., Pollicino, T., Prati, D., Puoti, M., Samuel, D., Shouval, D., Smedile, A., Squadrito, G., Trepo, C., Villa, E., Will, H., Zanetti, A.R., and Zoulim, F., *Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2008. **49**(4): p. 652-7.
75. Westhoff, T.H., Jochimsen, F., Schmittel, A., Stoffler-Meilicke, M., Schafer, J.H., Zidek, W., Gerlich, W.H., and Thiel, E., *Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1930.
76. Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V., *Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(1): p. 25-36.

77. Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., and Chisari, F.V., *Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection*. Science, 1999. **284**(5415): p. 825-9.
78. Guo, J.T., Zhou, H., Liu, C., Aldrich, C., Saputelli, J., Whitaker, T., Barrasa, M.I., Mason, W.S., and Seeger, C., *Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1495-505.
79. Shouval, D., *Hepatitis B vaccines*. J Hepatol, 2003. **39 Suppl 1**: p. S70-6.
80. Protzer, U. and Schaller, H., *Immune escape by hepatitis B viruses*. Virus Genes, 2000. **21**(1-2): p. 27-37.
81. Cooreman, M.P., Leroux-Roels, G., and Paulij, W.P., *Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen*. J Biomed Sci, 2001. **8**(3): p. 237-47.
82. Locarnini, S., *Interpretation and application of virological testing including resistance in chronic hepatitis B*. Med J Malaysia, 2005. **60 Suppl B**: p. 41-51.
83. Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A.J., and Thomas, H.C., *Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus*. Lancet, 1990. **336**(8711): p. 325-9.
84. Waters, J.A., Kennedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W., and Thomas, H.C., *Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2543-7.
85. Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lin, C.C., and Chien, C.S., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
86. Arbuthnot, P. and Kew, M., *Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma*. Int J Exp Pathol, 2001. **82**(2): p. 77-100.
87. Cougot, D., Neuveut, C., and Buendia, M.A., *HBV induced carcinogenesis*. J Clin Virol, 2005. **34 Suppl 1**: p. S75-8.
88. Iloeje, U.H., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., Chen, C.J., Risk Evaluation of Viral Load, E., and Associated Liver Disease/Cancer-In, H.B.V.S.G., *Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 678-86.
89. 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., and et al., *A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group*. N Engl J Med, 1990. **323**(5): p. 295-301.
90. Wong, D.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., Naylor, C.D., Detsky, A.S., and Heathcote, J., *Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis*. Ann Intern Med, 1993. **119**(4): p. 312-23.
91. Perrillo, R., *Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B*. Hepatology, 2009. **49**(5 Suppl): p. S103-11.
92. Gish, R.G., *Hepatitis B treatment: Current best practices, avoiding resistance*. Cleve Clin J Med, 2009. **76 Suppl 3**: p. S14-9.
93. Zoulim, F. and Locarnini, S., *Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1593-608 e1-2.
94. Ghany, M. and Liang, T.J., *Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1574-85.
95. Reynaud, L., Carleo, M.A., Talamo, M., and Borgia, G., *Tenofovir and its potential in the treatment of hepatitis B virus*. Ther Clin Risk Manag, 2009. **5**(1): p. 177-85.
96. Zoulim, F. and Locarnini, S., *Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance*. Liver Int, 2013. **33 Suppl 1**: p. 116-24.
97. Volz, T., Allweiss, L., MB, M.B., Warlich, M., Lohse, A.W., Pollok, J.M., Alexandrov, A., Urban, S., Petersen, J., Lutgehetmann, M., and Dandri, M., *The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with Hepatitis B Virus*. J Hepatol, 2012.

98. Delaney, W.E., *Molecular virology of chronic hepatitis B and C: Parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome*. Antiviral Research, 2013. **99**(1): p. 34-48.
99. Dreesman, J.M., Baillot, A., Hamschmidt, L., Monazahian, M., Wend, U.C., and Gerlich, W.H., *Outbreak of hepatitis B in a nursing home associated with capillary blood sampling*. Epidemiol Infect, 2006. **134**(5): p. 1102-13.
100. Ribeiro, R.M. and Perelson, A.S., *Hepatitis B virus viral dynamics: effects of drug dose and baseline alanine aminotransferase*. J Hepatol, 2002. **37**(2): p. 277-9.
101. Girones, R. and Miller, R.H., *Mutation rate of the hepadnavirus genome*. Virology, 1989. **170**(2): p. 595-7.
102. Park, S.G., Kim, Y., Park, E., Ryu, H.M., and Jung, G., *Fidelity of hepatitis B virus polymerase*. European Journal of Biochemistry, 2003. **270**(14): p. 2929-2936.
103. Seeger, C. and Mason, W.S., *Hepatitis B virus biology*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(1): p. 51-68.
104. Lewin, S.R., Ribeiro, R.M., Walters, T., Lau, G.K., Bowden, S., Locarnini, S., and Perelson, A.S., *Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed*. Hepatology, 2001. **34**(5): p. 1012-20.
105. Tillmann, H.L., *Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 125-40.
106. Stuyver, L.J., Locarnini, S.A., Lok, A., Richman, D.D., Carman, W.F., Dienstag, J.L., and Schinazi, R.F., *Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region*. Hepatology, 2001. **33**(3): p. 751-7.
107. Delaney, W.E.t., Locarnini, S., and Shaw, T., *Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation*. Antivir Chem Chemother, 2001. **12**(1): p. 1-35.
108. Angus, P., Vaughan, R., Xiong, S., Yang, H., Delaney, W., Gibbs, C., Brosgart, C., Colledge, D., Edwards, R., Ayres, A., Bartholomeusz, A., and Locarnini, S., *Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 292-7.
109. Fung, S.K., Chae, H.B., Fontana, R.J., Conjeevaram, H., Marrero, J., Oberhelman, K., Hussain, M., and Lok, A.S., *Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B*. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 283-90.
110. Lok, A.S., Zoulim, F., Locarnini, S., Bartholomeusz, A., Ghany, M.G., Pawlotsky, J.M., Liaw, Y.F., Mizokami, M., Kuiken, C., and Hepatitis, B.V.D.R.W.G., *Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 254-65.
111. van Bommel, F., de Man, R.A., Wedemeyer, H., Deterding, K., Petersen, J., Buggisch, P., Erhardt, A., Huppe, D., Stein, K., Trojan, J., Sarrazin, C., Bocher, W.O., Spengler, U., Wasmuth, H.E., Reinders, J.G., Moller, B., Rhode, P., Feucht, H.H., Wiedenmann, B., and Berg, T., *Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 73-80.
112. Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I.M., Washington, M.K., Germanidis, G., Flaherty, J.F., Schall, R.A., Bornstein, J.D., Kitrinis, K.M., Subramanian, G.M., McHutchison, J.G., and Heathcote, E.J., *Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study*. Lancet, 2013. **381**(9865): p. 468-75.
113. Durantel, D., Brunelle, M.N., Gros, E., Carrouee-Durantel, S., Pichoud, C., Villet, S., Trepo, C., and Zoulim, F., *Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing*. J Clin Virol, 2005. **34** **Suppl 1**: p. S34-43.
114. Lok, A.S., Zoulim, F., Locarnini, S., Mangia, A., Niro, G., Decraemer, H., Maertens, G., Hulstaert, F., De Vreese, K., and Sablon, E., *Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3729-34.

115. Yuen, L.K., Ayres, A., Littlejohn, M., Colledge, D., Edgely, A., Maskill, W.J., Locarnini, S.A., and Bartholomeusz, A., *SeqHepB: a sequence analysis program and relational database system for chronic hepatitis B*. *Antiviral Res*, 2007. **75**(1): p. 64-74.
116. Bartholomeusz, A. and Schaefer, S., *Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods*. *Rev Med Virol*, 2004. **14**(1): p. 3-16.
117. Zoulim, F., *Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease*. *J Hepatol*, 2006. **44**(1 Suppl): p. S95-9.
118. Gunther, S., Li, B.C., Miska, S., Kruger, D.H., Meisel, H., and Will, H., *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*, 1995. **69**(9): p. 5437-44.
119. Delaney, W.E.t. and Isom, H.C., *Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus*. *Hepatology*, 1998. **28**(4): p. 1134-46.
120. Sprinzl, M.F., Oberwinkler, H., Schaller, H., and Protzer, U., *Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier*. *J Virol*, 2001. **75**(11): p. 5108-18.
121. Yang, H., Westland, C., Xiong, S., and Delaney, W.E.t., *In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector*. *Antiviral Res*, 2004. **61**(1): p. 27-36.
122. Langley, D.R., Walsh, A.W., Baldick, C.J., Eggers, B.J., Rose, R.E., Levine, S.M., Kapur, A.J., Colonno, R.J., and Tenney, D.J., *Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir*. *J Virol*, 2007. **81**(8): p. 3992-4001.
123. Villet, S., Ollivet, A., Pichoud, C., Barraud, L., Villeneuve, J.P., Trepo, C., and Zoulim, F., *Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient*. *J Hepatol*, 2007. **46**(3): p. 531-8.
124. Allen, M.I., Deslauriers, M., Andrews, C.W., Tipples, G.A., Walters, K.A., Tyrrell, D.L., Brown, N., and Condeay, L.D., *Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine*. *Lamivudine Clinical Investigation Group*. *Hepatology*, 1998. **27**(6): p. 1670-7.
125. Barker, L.F., Maynard, J.E., Purcell, R.H., Hoofnagle, J.H., Berquist, K.R., London, W.T., Gerety, R.J., and Krushak, D.H., *Hepatitis B virus infection in chimpanzees: titration of subtypes*. *J Infect Dis*, 1975. **132**(4): p. 451-8.
126. Su, J.J., *[Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews]*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 1987. **16**(2): p. 103-6, 22.
127. Yan, R.Q., Su, J.J., Huang, D.R., Gan, Y.C., Yang, C., and Huang, G.H., *Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. **122**(5): p. 283-8.
128. Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I., and Blum, H.E., *Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo*. *Hepatology*, 1996. **24**(1): p. 1-5.
129. Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E.V., Valerius, K.P., and Gerlich, W.H., *Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus*. *J Virol*, 2003. **77**(17): p. 9511-21.
130. Seiz, P., *Antivirale Resistenzprofile von Hepatitis-B-Virus Mutanten in vitro.*, in *Medical Virology2011*, Justus-Liebig University Gießen.
131. Geipel, A., *Phänotypische Charakterisierung klinisch relevanter Hepatitis-B-Virus-Mutanten*, in *Medical Virology2011*, Justus-Liebig University Gießen.
132. Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M.C., Silini, E.M., Andreone, P., Missale, G., and Ferrari, C., *Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(2): p. 682-U348.
133. Zhang, E., Zhang, X., Liu, J., Wang, B., Tian, Y., Kosinska, A.D., Ma, Z., Xu, Y., Dittmer, U., Roggendorf, M., Yang, D., and Lu, M., *The expression of PD-1 ligands and their involvement in regulation of T cell functions in acute and chronic woodchuck hepatitis virus infection*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26196.

134. Glebe, D., Lorenz, H., Gerlich, W.H., Butler, S.D., Tochkov, I.A., Tennant, B.C., Cote, P., and Menne, S., *Correlation of virus and host response markers with circulating immune complexes during acute and chronic woodchuck hepatitis virus infection*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1579-91.
135. Tolle, T.K., Glebe, D., Linder, M., Linder, D., Schmitt, S., Geyer, R., and Gerlich, W.H., *Structure and glycosylation patterns of surface proteins from woodchuck hepatitis virus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9978-85.
136. Gerlich, W.H., Wend, U., and Glebe, D., *Quantitative assay of hepatitis B surface antigen in serum or plasma using laurell electrophoresis*. Methods Mol Med, 2004. **95**: p. 57-63.
137. Lu, M., Yao, X., Xu, Y., Lorenz, H., Dahmen, U., Chi, H., Dirsch, O., Kemper, T., He, L., Glebe, D., Gerlich, W.H., Wen, Y., and Roggendorf, M., *Combination of an antiviral drug and immunomodulation against hepadnaviral infection in the woodchuck model*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2598-603.
138. Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
139. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B.B., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. Nature, 1979. **282**(5739): p. 615-6.
140. Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T., *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. Cancer Res., 1952. **12**: p. 164-265.
141. Chudy, M., Hanschmann, K.-M., Scheiblaue, H., Wend, U.C.S., C. G.; , Gerlich, W.H., Nick, S., Kreß, J., and Nübling, C.M., *Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Hepatitis B Virus Genotype Panel for HBsAg Assays* WHO Report 2009, 2009. **WHO/BS/11.2180**.
142. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
143. Lorenz, H., *Replikation von drei Säuger-Hepadnaviren im Amerikanischen Waldmurmeltier (Marmota monax) und Expression der viralen Oberflächenproteine in transgenen Pflanzen.*, in *Medical Virology 2006*, Justus-Liebig University Gießen.
144. Kott, N., *Uptake mechanism of Hepatitis B Virus into susceptible primary hepatocyte cultures*, in *Medical Virology 2010*, Justus-Liebig-University Gießen.
145. Kosinska, A.D., Zhang, E., Johrden, L., Liu, J., Seiz, P.L., Zhang, X., Ma, Z., Kemper, T., Fiedler, M., Glebe, D., Wildner, O., Dittmer, U., Lu, M., and Roggendorf, M., *Combination of DNA prime--adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003391.
146. Liu, J., Zhang, E., Ma, Z., Wu, W., Kosinska, A., Zhang, X., Moller, I., Seiz, P., Glebe, D., Wang, B., Yang, D., Lu, M., and Roggendorf, M., *Enhancing Virus-Specific Immunity In Vivo by Combining Therapeutic Vaccination and PD-L1 Blockade in Chronic Hepadnaviral Infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(1): p. e1003856.
147. Hadziyannis, S.J., Tassopoulos, N.C., Heathcote, E.J., Chang, T.T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S.G., Goodman, Z., Ma, J., Brosgart, C.L., Borroto-Esoda, K., Arterburn, S., Chuck, S.L., and Adefovir Dipivoxil 438 Study, G., *Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1743-51.
148. Sherman, M., Yurdaydin, C., Sollano, J., Silva, M., Liaw, Y.F., Cianciara, J., Boron-Kaczmarek, A., Martin, P., Goodman, Z., Colonno, R., Cross, A., Denisky, G., Kreter, B., Hindes, R., and Group, A.I.B.S., *Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2006. **130**(7): p. 2039-49.

149. Chang, T.T., Gish, R.G., de Man, R., Gadano, A., Sollano, J., Chao, Y.C., Lok, A.S., Han, K.H., Goodman, Z., Zhu, J., Cross, A., DeHertogh, D., Wilber, R., Colonno, R., Apelian, D., and Group, B.E.A.S., *A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(10): p. 1001-10.
150. Ghany, M.G. and Doo, E.C., *Antiviral resistance and hepatitis B therapy*. *Hepatology*, 2009. **49**(5 Suppl): p. S174-84.
151. Villet, S., Pichoud, C., Billioud, G., Barraud, L., Durantel, S., Trepo, C., and Zoulim, F., *Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure*. *J Hepatol*, 2008. **48**(5): p. 747-55.
152. Chang, C.M., Jeng, K.S., Hu, C.P., Lo, S.J., Su, T.S., Ting, L.P., Chou, C.K., Han, S.H., Pfaff, E., Salfeld, J., and et al., *Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line*. *EMBO J*, 1987. **6**(3): p. 675-80.
153. Roingard, P. and Sureau, C., *Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis*. *Hepatology*, 1998. **28**(4): p. 1128-33.
154. Niekamp, H., *Charakterisierung der phänotypischen Resistenz von Hepatitis-B-Virus Mutanten gegenüber antiviralen Nucleosid- und Nucleotidanaloga*, in *Medical Virology 2013*, Justus-Liebig-University Gießen.
155. Lengruher, R.B., Delviks-Frankenberry, K.A., Nikolenko, G.N., Baumann, J., Santos, A.F., Pathak, V.K., and Soares, M.A., *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*, 2011. **66**(4): p. 702-8.
156. Lanford, R.E., Notvall, L., and Beames, B., *Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells*. *J Virol*, 1995. **69**(7): p. 4431-9.
157. Protzer, U., Maini, M.K., and Knolle, P.A., *Living in the liver: hepatic infections*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 201-13.
158. Rehmann, B. and Nascimbeni, M., *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(3): p. 215-29.
159. Yuki, N., Nagaoka, T., Yamashiro, M., Mochizuki, K., Kaneko, A., Yamamoto, K., Omura, M., Hikiji, K., and Kato, M., *Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1172-9.
160. Miller, D.S., Boyle, D., Feng, F., Reaiche, G.Y., Kotlarski, I., Colonno, R., and Jilbert, A.R., *Antiviral therapy with entecavir combined with post-exposure "prime-boost" vaccination eliminates duck hepatitis B virus-infected hepatocytes and prevents the development of persistent infection*. *Virology*, 2008. **373**(2): p. 329-41.
161. Menne, S., Roneker, C.A., Tennant, B.C., Korba, B.E., Gerin, J.L., and Cote, P.J., *Immunogenic effects of woodchuck hepatitis virus surface antigen vaccine in combination with antiviral therapy: breaking of humoral and cellular immune tolerance in chronic woodchuck hepatitis virus infection*. *Intervirology*, 2002. **45**(4-6): p. 237-50.
162. Zhang, Z., Zhang, J.Y., Wherry, E.J., Jin, B., Xu, B., Zou, Z.S., Zhang, S.Y., Li, B.S., Wang, H.F., Wu, H., Lau, G.K., Fu, Y.X., and Wang, F.S., *Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(7): p. 1938-49, 1949 e1-3.
163. Klenerman, P. and Hill, A., *T cells and viral persistence: lessons from diverse infections*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(9): p. 873-9.
164. Wherry, E.J., Blattman, J.N., and Ahmed, R., *Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 8960-8.
165. Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V., *CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection*. *J Virol*, 2003. **77**(1): p. 68-76.

166. Sallberg, M., Hughes, J., Javadian, A., Ronlov, G., Hultgren, C., Townsend, K., Anderson, C.G., O'Dea, J., Alfonso, J., Eason, R., Murthy, K.K., Jolly, D.J., Chang, S.M., Mento, S.J., Milich, D., and Lee, W.T., *Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(12): p. 1719-29.
167. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.
168. Nienhuis, A.W., *Development of gene therapy for blood disorders: an update*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1556-64.
169. Martinot-Peignoux, M., Lapalus, M., Asselah, T., and Marcellin, P., *The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome*. Liver Int, 2013. **33 Suppl 1**: p. 125-32.
170. Tseng, T.C. and Kao, J.H., *Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog*. J Gastroenterol, 2013. **48**(1): p. 13-21.
171. Tai, D.I., Lin, S.M., Sheen, I.S., Chu, C.M., Lin, D.Y., and Liaw, Y.F., *Long-term outcome of hepatitis B e antigen-negative hepatitis B surface antigen carriers in relation to changes of alanine aminotransferase levels over time*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1859-67.
172. Chen, Y.C., Sheen, I.S., Chu, C.M., and Liaw, Y.F., *Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1084-9.
173. Glebe, D., Berting, A., Broehl, S., Naumann, H., Schuster, R., Fiedler, N., Tolle, T.K., Nitsche, S., Seifer, M., Gerlich, W.H., and Schaefer, S., *Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture*. Intervirology, 2001. **44**(6): p. 370-8.
174. Naumann, H., Schaefer, S., Yoshida, C.F., Gaspar, A.M., Repp, R., and Gerlich, W.H., *Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4*. J Gen Virol, 1993. **74 (Pt 8)**: p. 1627-32.

10. Abkürzungen

a (anti-)	Antikörper gegen
°C	Grad Celsius
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy
ca.	circa
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DR	Direct repeat
E. coli	<i>“Escherichia coli”</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FKS	Fötale Kälber-Serum
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GE	Genomäquivalente
GRE	<i>Glucocorticoid-Responsive-Element</i>
GSHV	Ground-Squirrel-Hepatitis-B-Virus
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis B-Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis B-Enigma-Antigen
HBsAg	Hepatitis B-Surface-Antigen

HBV	Hepatitis-B-Virus
HHBV	<i>Heron</i> -Hepatitis-B-Virus
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	Zu 50 % Inhibitorische Konzentration
ID	Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IU	<i>International Unit</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>“Lysogeny Broth”</i>
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
m..	Milli
m	Meter
M	Molarität (mol/l Lösung)
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
min	Minuten
mol	Molar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
myr	myristoyliert
n..	nano
N-	Amino-
NA	Nukleos(t)idanaloga
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRE	negativ regulierendes Element
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
Pr	Primer
pH	potentia hydrogenii
PRE	Posttranslationales-Regulatorisches-Element

RNA	Ribonukleinsäure
RF	Resistenzfaktor
RH	RNaseH
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT/rt	Reverse Transkriptase
rev	reverse
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B surface protein
Sig.	Signifikanz
Sp	Spacer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Woolly monkey Hepatitis B Virus
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

11. Anhang

Tabelle 9: WHsAg-Konzentration im Serum der Tiere 61792, 61793, 61786 und 61795 während des Therapieverlaufs. Die Werte wurden mit der Laurell-Elektrophorese ermittelt und mit dem Standardserum 5413 quantifiziert. Die Blutabnahme erfolgte jeweils alle 1-3 Wochen. Blau: Gabe von Entecavir; rot: Zeitpunkte der DNA-Vakzinierung; nb: nicht bestimmt.

Woche	WHsAg [$\mu\text{g/ml}$]			
	61792	61793	61786	61795
-1	---	325,8	693,8	128,9
0	96,2	424,3	627,5	96,0
2	96,2	358,7	612,4	144,0
4	96,2	250,1	575,1	144,0
6	53,9	278,4	575,1	137,4
8	53,9	223,1	575,1	137,4
10	53,9	279,5	611,2	137,4
12	10,7	241,1	434,6	117,7
14	+/-	219,0	238,2	78,3
16	+/-	220,7	253,3	78,3
19	+/-	250,1	238,2	99,0
22	+/-	161,7	162,7	68,4
25	+/-	128,9	117,4	53,1
27	+/-	128,9	132,5	60,7
29	+/-	128,9	68,3	53,1
31	+/-	96,0	160,2	114,4
33	+/-	96,0	108,1	145,0
35	+/-	nb	nb	nb
38	+/-	nb	nb	nb
40	+/-	nb	nb	nb

Tabelle 10: WHsAg-Konzentration im Serum der Tiere 70102, 70104 und 70108 während des Therapieverlaufs. Die Werte wurden mit der Laurell-Elektrophorese ermittelt und mit dem Standardserum 5413 quantifiziert. Die Blutabnahme erfolgte jeweils alle 1-3 Wochen. Blau: Gabe von Entecavir; rot: Zeitpunkte der DNA-Vakzinierung; nb: nicht bestimmt.

Woche	WHsAg [$\mu\text{g/ml}$]		
	70102	70104	70108
0	698,32	45,82	686,42
2	698,32	52,18	512,61
4	698,32	52,18	454,67
6	164,68	58,53	186,42
8	95,07	52,18	108,78
10	25,47	58,53	147,60
11	25,47	47,74	147,60
12	164,68	33,41	108,78
14	303,89	19,09	147,60
16	164,68	26,25	31,15
17	95,07	26,25	69,97
20	94,77	26,25	49,11
22	94,77	26,25	88,06
25	73,79	26,25	57,52
26	55,10	19,09	39,19
27	60,76	11,92	69,74
28	55,10	26,25	26,98
30	55,10	33,41	8,65
32	43,78	40,58	2,54
34	43,78	47,74	47,50
36	49,44	54,90	13,18
38	118,28	40,58	6,32
40	647,28	40,58	6,32
42	911,78	17,51	6,32
44	nb	nb	6,32

12. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt **PD Dr. Dieter Glebe** für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Medizinische Virologie anfertigen zu können. Vielen Dank für das spannende Thema, die gute Betreuung sowie für die hilfreichen Gespräche.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau **Prof. Dr. T. Trenczek** für die Begutachtung und die Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich 08, Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn **Prof. Dr. W. H. Gerlich** danke ich ganz herzlich für die kritische Begutachtung meiner Arbeit sowie für die Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Herrn **Prof. Dr. M. Martin** danke ich für die freundliche Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Medizinische Virologie und besonders der AG Glebe. Vielen Dank an **Siggi, Andi, Alex, Tina, Hauke, Corinna** und **Franzi** für die gute Zusammenarbeit und das familiäre Arbeitsklima. Die Zeit mit euch war super!

Ich danke außerdem meinen **Eltern** und meiner Schwester **Julia**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich in allem unterstützt.

13. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

14. Publikationen

A.D. Kosinska, E. Zhang, L. Johrden, J. Liu, **P.L. Seiz**, X. Zhang, Z. Ma, T. Kemper, M. Fiedler, D. Glebe, O. Wildner, U. Dittmer, M. Lu, and M. Roggendorf, **Combination of DNA prime--adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model.** PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003391

J. Liu, E. Zhang, Z. Ma, W. Wu, A. Kosinska, X. Zhang, I. Moller, **P. Seiz**, D. Glebe, B. Wang, D. Yang, M. Lu, and M. Roggendorf, **Enhancing Virus-Specific Immunity In Vivo by Combining Therapeutic Vaccination and PD-L1 Blockade in Chronic Hepadnaviral Infection.** PLoS Pathog, 2014. **10**(1): p. e1003856.

P.L. Seiz, H. Niekamp, A. Geipel, K. Zhang, U. Protzer, F. van Boemmel, D. Glebe, **Mutations within the terminal protein of hepatitis B virus polymerase contribute to antiviral resistance against Adefovir and Tenofovir.** Manuskript in Vorbereitung.

15. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Pia Seiz