

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der Universität
Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
(Abteilung Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie)

**Phänotypische Analyse der antiviralen Hepatitis-B-
Resistenzmutationen gegenüber Adefovir Dipivoxil
rtT128I, rtT128N und rtN248H/E263D**

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

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

**vorgelegt von
Wollboldt, Christian-Maximilian**

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C.-T. Bock

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Berg

Tag der Disputation: 21.06.2018

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1.1 Historie und Epidemiologie der Hepatitis B.....	1
1.1.2 Taxonomie und Genotypen.....	2
1.2 Virologie des Hepatitis B Virus.....	5
1.2.1 Virusaufbau.....	5
1.2.2 Das Hepatitis B-Genom	7
1.2.3 Hepatitis B Virus-Proteine.....	9
1.2.4 Der Hepatitis B Virus-Lebenszyklus.....	11
1.2.5 Immunpathogenese der Hepatitis B Infektion.....	14
1.3. Klinischer Verlauf der HBV-Infektion	16
1.3.1 Infektionsweg.....	16
1.3.2 Die Akute Hepatitis B Infektion.....	16
1.3.3 Die chronische HBV Infektion	17
1.4 Therapie der chronischen Hepatitis B	19
1.4.1 Interferon α	21
1.4.2 Nukleosid-/ Nukleotidanaloga	22
1.5.1 Mutationen und Ausbildung von Therapieresistenzen.....	25
1.5.2 Therapieresistenzen unter Nucleosid-/ Nukleotidtherapie	27
1.5.3 Weitere Mutationen.....	30
1.5.4 Detektion von Resistenzmutationen.....	32
1.6.Zielsetzung dieser Doktorarbeit	33
2. Materialien und Methoden.....	35
2.1 Lösungen, Puffer	35
2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	35
2.1.2 Lösungen für die Zellkultur	36
2.1.3 Puffer und Lösungen für Bakterienkultivierung	36
2.1.4 Lösung für die Zellernte	37
2.2 Kommerzielle Kits	38
2.3 Enzyme	38
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	38
2.5 Geräte und Zubehör	39
2.6 Primersequenzen für PCR	40
2.7 Methoden.....	40
2.7.1 Identifizierung potenzieller Adefovir-Resistenzmutationen	40
2.7.2 Generierung der Replikons mit der Mutation rtT128I und rtT128N mittels <i>site directed mutagenesis</i>	41
2.7.3 Plasmid DNA Präparation	42
2.7.4 Kultivierung der Bakterien	42
2.7.5 Maxi-Präparation.....	43
2.7.6 Mini Präparation.....	43
2.7.7 Restriktionsverdau	44
2.7.8 Gelelektrophorese	44
2.7.9 Isolation der DNA Fragmente aus dem Gel	45
2.7.10 Ligation.....	45
2.7.11 PCR zur <i>site directed mutagenesis</i>	45
2.7.12 Dpn I Verdau.....	46
2.7.13 Transformation	46
2.8.3 Zellernte	49
2.8.4 DNase- und Proteinase-Verdau	49
2.8.5 DNA-Extraktion.....	50
2.9 Quantitative PCR.....	50

2.10 Statistische Auswertung der Messdaten.....	52
3 Ergebnisse.....	54
3.1 Genotypische Analyse von potenziellen antiviralen Resistenzmutationen in der Polymerasedomäne von Patienten unter Adefovirtherapie	54
3.2 Generierung replikationskompetenter HBV-Plasmide mit Punktmutationen rtT128N und rtT128I.....	56
3.2.1 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil bei mit Wildtyp pHBV 1,28 transfizierten HepG2-Zellen	58
3.2.2 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der Resistenzmutation rtN236T in transfizierten HepG2-Zellen.....	60
3.3.3 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der potenziellen Resistenzmutation rtT128I in transfizierten HepG2- Zellen.....	62
3.3.4 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der potenziellen Resistenzmutation rtT128N in transfizierten HepG2- Zellen	63
3.3.5 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil in mit pHBV rtN248H/rtE263D transfizierten HepG2-Zellen.....	65
3.4.1 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit Wildtyp-Replikon pHBV ayw 1,28 transfizierten HepG2-Zellen.....	68
3.4.2 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBV rtN236T transfizierten HepG2- Zellen.....	69
3.4.3 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBV rtT128I transfizierten HepG2-Zellen.....	71
3.4.4 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBVrt T128N transfizierten HepG2-Zellen	73
3.5 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse.....	75
4. Diskussion	79
4.1 Identifizierung potenzieller Resistenzmutationen auf Adefovir Dipivoxil	79
4.2 rtE263D zeigt keinen zusätzlichen Effekt auf die verminderte Sensitivität von rtN248H auf Adefovir Disoproxil	82
4.3 Die Mutationen rtT128I und rtT128N zeigen gegenüber Adefovir Disoproxil eine verminderte Sensitivität.....	85
4.4 Adefovir Disoproxil hat eine Resistenz bei rtN236T <i>in vitro</i>	87
4.5 Tenofovir Disoproxil zeigt eine verminderte Effektivität bei rtN236T <i>in vitro</i>	88
4.6 Tenofovir Disoproxil senkt die Viruslast in mit rtT128N- und rtT128I-Replikons transfizierten HEPG2-Zellen suffizient.....	90
4.7 Fazit und Ausblick	91
5. Zusammenfassung.....	94
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	105
Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ADV	Adefovir dipivoxil
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
BCP	Basal Core Promotor
C	Cystein
cccDNA	covalently closed circle DNA
CD	Cluster of Differentiation
CHB	chronische Hepatitis B
D	Aspartat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	
DR	Direct Repeat
E	Glutaminsäure
EDTA	EthylenDiaminTetraAzetat
ENH	Enhancer
H	Histidin
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B early Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Human Immunodeficiency Virus
I	Isoleucin
IC	inhibitory concentration
IE	internationale Einheit
IFN	Interferon
kb	Kilobase

kbp	Kilobasenpaar
LAM	Lamivudin
LB	Luria Bertani
L	Lysin
M	Methionin
MHC	Major Histocompatibility Complex
N	Asparagin
nt	Nukleotid
NUC	Nukleosid-/Nukleotidanalogen
ORF	Open Reading Frame
P	Prolin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEG-IFN	pegyliertes Interferon
pgRNA	prägenomische RNA (HBV)
pHBV	Hepatitis B Plasmid
Q	Glutamin
qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR
rcDNA	relaxed circular DNA
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rotations per minute
RT	reverse Transkriptase
S	Serin
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TNV	Tenofovir Disoproxil
T	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Valin
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
Y	Thyrosin

1 Einleitung

1.1.1 Historie und Epidemiologie der Hepatitis B

Die viralen Hepatitiden gehören zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit mit einer stetig wachsenden Mortalität (WHO, 2017). Vor allem die Hepatitis B stellt nach wie vor, trotz Einführung eines effektiven Impfstoffes sowie großen Fortschritten in der Pharmakotherapie der chronischen Hepatitis B (CHB) durch Komplikationen, wie der Leberzirrhose und des Hepatozellulärem Karzinoms (HCC), eine große Herausforderung für die Ärzte und Wissenschaftler dar.

Eine der ersten historischen Erwähnungen einer Hepatitisinfektion durch Serumkontakt erfolgte 1885 durch August Lürman, der eine Gelbsuchtepidemie bei Bremer Werftarbeitern im Jahr 1883 nach einer Pockenvakzination beschrieb (Lürmann, 1885). Mac Callum vermutete als einer der ersten in den 1940er Jahren eine Virusinfektion als Ursache für die Erkrankung britischer Soldaten nach Gelbfieberimpfung und prägte den Begriff der Hepatitis B, im Gegensatz zu einer Hepatitis A Infektion, die durch fäkal-orale Übertragung ausgelöst wurde (MacCallum FO et al., 1951).

1967 konnte Blumberg aus Serum australischer Ureinwohner das "*Australian Antigen*" als Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBV) isolieren für das er 1976 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde (Blumberg *et al.*, 1967). Schließlich gelang es 1970 Dane die ersten Hepatitis-B-Virionen, die sogenannten Dane-Partikel durch eine elektronenmikroskopische Abbildung abzubilden (Dane, Cameron and Briggs, 1970). Ab 1975 konnten die ersten Studien für einen Hepatitis-B-Impfstoff eingeleitet werden, welcher dann ab 1981 erstmalig kommerziell eingesetzt wurde (Szmuness *et al.*, 1980).

Bei etwa zwei Milliarden Menschen kann eine HBV-Infektion oder der Kontakt mit Infizierten nachgewiesen werden, wobei etwa 257 Millionen Menschen chronische Träger sind (WHO, 2017). Die Prävalenz beträgt

zwischen 0.1-20 %, im Mittel 3,5 %. Während Erdteile wie Westeuropa eine niedrige Prävalenz von 0,1 % aufweisen, gelten Teile wie Subsahara-Afrika sowie die Westpazifikstaaten mit einer Prävalenz von 6% als Hochprävalenzgebiete (WHO global hepatitis report). Die Inzidenz lag in Deutschland im Jahre 2006 mit 2524 Neuinfektionen bei 1.4 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Betrug die Anzahl an Neuinfektionen 1997 noch 6135, war dieser starke Rückgang auf die Einführung flächendeckender Impfprogramme zurück zu führen. Seit 2015 ist ein Anstieg der Inzidenzraten zu beobachten, mit einer Inzidenz von 3,7/100.000 Einwohnern. Bei Schulanfängern in Deutschland lag die Rate an geimpften Kindern im Jahre 2012 bei 87 % (Von Laer A, 2017). Perinatal infizierte Neugeborene haben mit 90 % ein über 180-Mal höheres Risiko der Chronifizierung der Infektion als Erwachsene. Dies erklärt die hohe Anzahl an Hepatitis B Infizierten in den Hochprävalenzgebieten, in denen die Geburtenrate hoch und die Impfungsrate gering ist. In Westeuropa erfolgt die Infektion überwiegend sexuell und parenteral vor allem durch „needle sharing“. Die Migration von Hochprävalenzgebiete in Niedrigprävalenzgebiete stellt eine große Herausforderung für die Gesundheitsversorgung dar. Vor allem durch ihre Hauptkomplikationen, der Leberzirrhose und des HCC ist die (chronische) Hepatitis B eine sozioökonomische Belastung für das Gesundheitswesen. Die Kosten für Hospitalisierung und Behandlung belaufen sich schätzungsweise in Deutschland auf 600 Millionen €. Im Jahr 2015 verstarben ca. 900.000 Menschen an den Folgen einer Hepatitis B Infektion weltweit (WHO, 2017).

1.1.2 Taxonomie und Genotypen

Das Hepatitis B Virus gehört zum Genus der Orthohepadnaviren, die bei Säugetieren vorkommen und zur übergeordneten Familie der *Hepadnaviridae* gehören. Hepadnaviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein Genom aus DNA besitzen, aber mittels reverser Transkription über ein virales RNA-Intermediat replizieren und eine Entzündung der Leber verursachen. Das Hepatitis B Virus ist sehr speziesspezifisch und findet sich außer beim Menschen nur noch bei vier weiteren Primatenarten (Gorilla, Gibbon, Oran Utan,

Schimpanse). Nächster nicht primatischer Verwandter ist das Wollaffen Hepatitisvirus. Zu dem Genus der Orthohepadnaviren gehören noch das *Woodchuck* Hepatitisvirus (WHV), welches das Walddarmmeltier befällt und das *Ground Squirrel* Hepatitisvirus (GSHV), welches den Ziesel befällt. 2013 konnten drei neue Spezies der *Orthohepadnaviridae* in Fledermausarten identifiziert werden (BtHBV) (Jan Felix Drexler *et al.*, 2013). Ein weiteres Genus der *Hepadnaviridae* ist das Avihepadnavirus, welches Enten und Reiher befällt. Durch Sequenzanalysen konnte das HBV phylogenetisch in zehn Genotypen (A-J) eingeteilt werden, wobei die einzelnen Genotypen sich durch eine Abweichung ihrer Nukleotidsequenz von über 8 % unterscheiden. Als Subgenotypen werden Abweichungen im Genom von 4-8 % unterteilt. Diese Subtypen werden bei den Genotypen A-D und F beschrieben. (Norder *et al.*, 2004). Die Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer geographischen Verteilung. Der Genotyp A ist vorwiegend in Nord- und Mitteleuropa, den USA, in der Subsahara und Westafrika verbreitet. Genotyp B und C sind vorherrschend in Ostasien, letzterer auch in Südostasien. Der Genotyp D ist vorherrschend in Afrika, den mediterranen Ländern, Nahost und Indien. Genotyp F und H finden sich überwiegend in Südamerika. Die zuletzt hinzugefügten Genotypen I wurden in Vietnam und Laos und der Genotyp J auf den Ryukyu-Inseln in Japan entdeckt. Die Genotypen I und J gelten in der Literatur bisher nicht vollständig akzeptiert als eigenständige Genotypen (Abb. 1.1). Phylogenetisch wird der Genotyp C als älteste humane HBV-Spezies vermutet (Paraskevis *et al.*, 2013). Die Ausbildung der verschiedenen Genotypen und seiner globalen Verbreitung kann alleine durch die hohe Mutationsrate des Virus, aufgrund des Fehlens eines *Proof-Readings* der viralen Polymerase nicht hinreichend erklärt werden. Als mögliche Erklärung wird eine Rekombination humaner HBV-Stämme untereinander oder mit denen in Tieren vorkommenden Spezies in Verbindung gebracht. Hinweise hierfür lieferten Untersuchungen zum Fledermaus-HBV, dessen Oberflächenantigen an das *hepatocyte receptor sodium taurocholate cotransporting protein* (NTCP) bindet und somit in die humane Leberzelle integriert werden kann (J. F. Drexler *et al.*, 2013). Weiterhin konnte gezeigt

werden, dass Rekombinationen von humanen HBV mit denen von Schimpansen und Gibbons existieren (Magiorkinis *et al.*, 2005) Tatematsu *et al.*, 2009),(Littlejohn, Locarnini and Yuen, 2016).

Die Unterscheidung einzelner Genotypen hat Auswirkung auf klinische Aspekte bezüglich des Übertragungswegs, der Pathogenität und antiviraler Therapie. Der Genotyp B und C wird überwiegend perinatal übertragen. Patienten mit Genotyp C und D haben einere höhere inflammatorische Aktivität, erlangen erst spät und seltener eine HBeAg-Serokonversion und entwickeln häufiger eine Leberzirrhose und ein HCC, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Bezüglich eines Ansprechens auf eine antivirale Therapie gibt es für PEG-Interferon- α Unterschiede zwischen den Genotypen. Hier wurde gezeigt, dass die Genotypen A und B besser auf eine Interferontherapie respondieren, als die Genotypen C und D (Janssen *et al.*, 2005). Bezüglich eines Einflusses von Genotypen auf eine Nucleosid-/Nucleotidtherapie konnten Untersuchungen keinen Zusammenhang finden (Damerow *et al.*, 2010). *In-vitro*-Studien zeigten, dass Genotyp-A-Konstrukte mit Adefovirmutation N236T ein geringeres Ansprechen auf Tenofovir haben Genotyp C -Konstrukte (Murakami *et al.*, 2016), bei insgesamt insgesamt nur intermediär verminderter Sensitivität gegenüber dem Wildtyp.

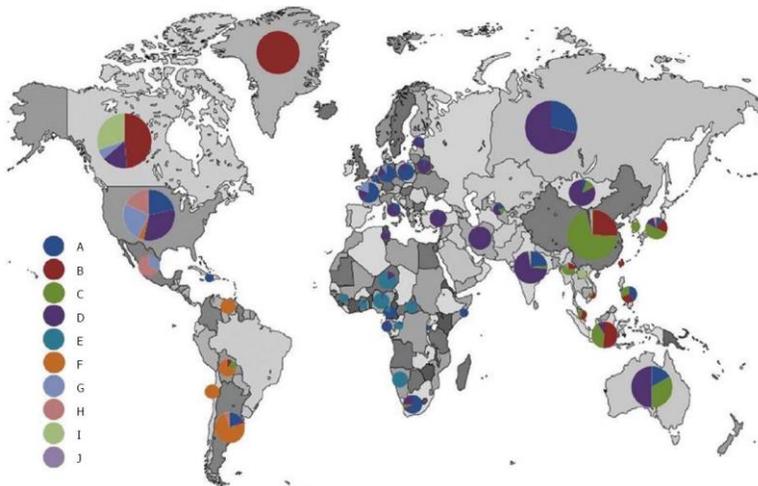


Abbildung 1.1 Kreisdiagramme mit den Verteilungen der einzelnen HBV Genotypen in den jeweiligen Regionen. Die einzelnen Genotypen A-J sind farblich dargestellt. Entnommen aus Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* 2014; 20(18): 5427-5434

1.2 Virologie des Hepatitis B Virus

1.2.1 Virusaufbau

Die infektiösen Partikel des HBV stellen die HBV-Virionen dar, die nach dem Entdecker Dane, Dane-Partikel genannt werden (Abb.1.2&1.3). Sie haben eine sphärische Struktur, einen Durchmesser von 42-52 nm und bestehen aus einer Hülle und einem Nukleokapsid (Dryden *et al.*, 2006)(Seitz *et al.*, 2007). Die Hülle besteht aus Glykolipiden, in die drei Arten von Oberflächeproteinen eingelagert sind, namentlich das *large-* (LHB), das *middle-* (MHB) und das *small- surface protein* (SHB). Sie werden zusammengefasst als Hepatitis Oberflächenantigen (HBs Antigen) (Dane, Cameron and Briggs, 1970). Dabei kommt das SHB am häufigsten vor. Das SHB bindet mit seiner a-Determinante an die anti-HBs-Antikörper (Glebe and Bremer, 2013). Das LHB hat eine maßgebliche Rolle für den Eintritt in die Wirtszelle mit seiner PreS1-Domäne (Glebe *et al.*, 2005)(Schulze, Gripon and Urban, 2007). Innerhalb des Virions befindet sich das ikosaedrische Nukleokapsid, mit einem Durchmesser von ca. 30-32 nm, das überwiegend aus 120-Dimeren aus Coreprotein-Untereinheiten besteht und in dessen Inneren sich das virale Genom in Form einer teilweise doppelsträngig relaxiert, zirkulären DNA (rcDNA) befindet (Roseman *et al.*, 2005). Der Minusstrang der DNA ist in der Primerdomäne kovalent mit der viralen Polymerase verbunden. Im Serum eines infektiösen Patienten lassen sich zudem zwei weitere nicht infektiöse leere Virushüllen, sogenannte subvirale Partikel (SVP) elektronenmikroskopisch darstellen (Abb. 1.2). Sie haben entweder eine sphärische oder filamentöse Struktur. Die sphärischen SVP haben einen Durchmesser von ca 20-25 nm, die Filamente kommen in unterschiedlichen Längen vor und haben einen Durchmesser von ca 20 nm (Abb 1.3). Die SVP werden 1000 bis 10000-facher Menge der Virionen gebildet und ins Serum abgegeben (Ganem and Prince, 2004). Sie sind nicht infektiös und dienen wahrscheinlich dazu Antikörper zu binden und somit die Immunantwort zu unterdrücken.

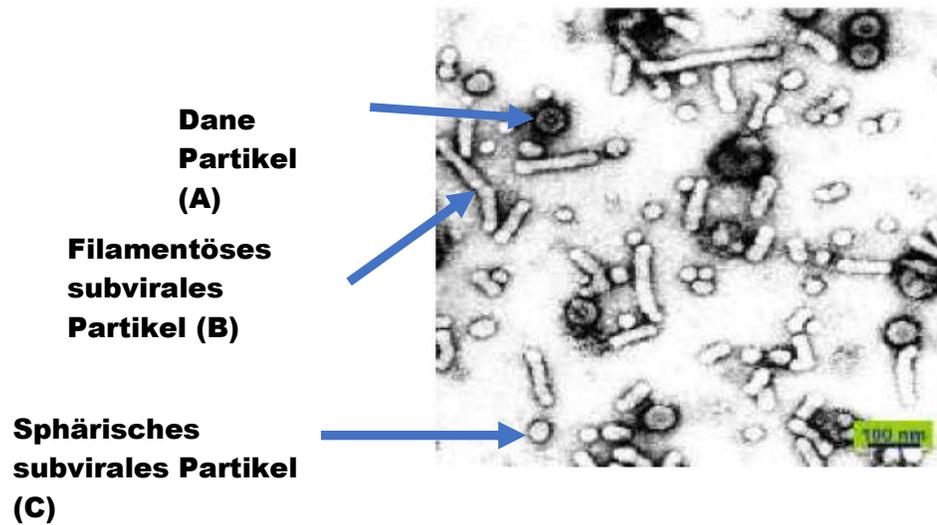


Abbildung 1.2 Elektronenmikroskopische Darstellung viraler Partikel aus dem Serum eines Patienten mit chronischer HBV-Infektion. Mit Pfeilen angezeigt sind Dane-Partikel (A), globuläre Partikel (B) und filamentöse Partikel (C). (Bock und Zentgraf, 1992).

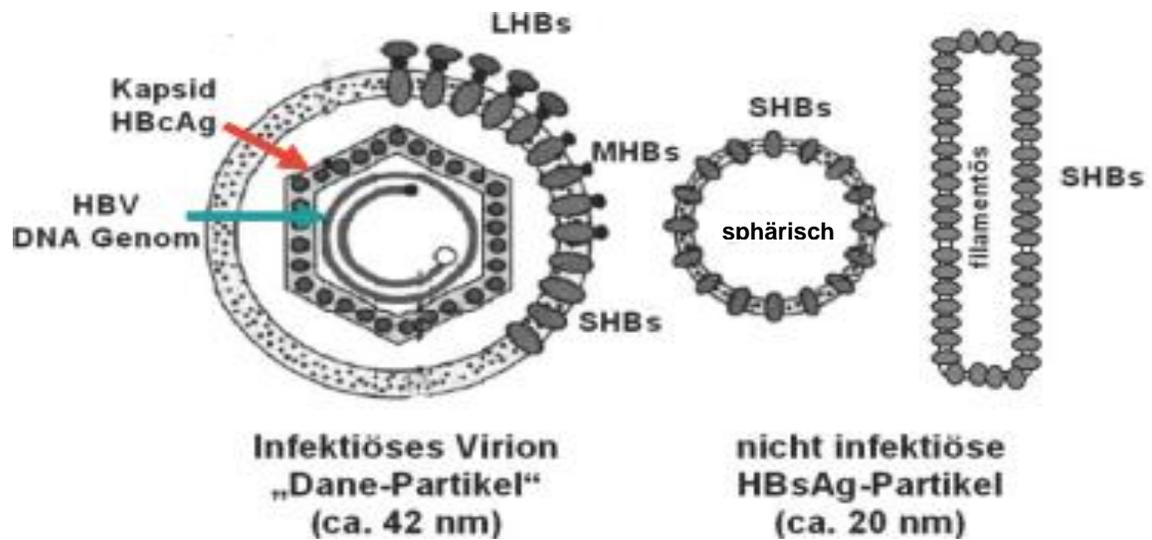


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines HBV Virions (rechts) und der nicht infektiösen subviralen Partikel (links), welche in sphärischer und filamentöser Form existieren. Die Abbildung ist entnommen aus (Bock CT 2006)

1.2.2 Das Hepatitis B-Genom

Das HBV-Genom besteht aus einer partiell doppelsträngig, zirkulär angeordneten DNA und hat eine Länge von ungefähr 3200 Basenpaaren (bp). Die Länge variiert abhängig vom Genotyp von 3182 bp (Genotyp D) bis 3248 bp (Genotyp G) (Bartholomeusz and Schaefer, 2004). Sein Aufbau ist wegen seiner geringen Größe komplex. Im HBV-Minusstrang ist die komplette genetische Information des Virus enthalten. An seinem 5'-Ende bindet die virale Polymerase kovalent an, die für die Replikation essentiell ist. Der HBV-Positivstrang deckt mit seiner Länge nur etwa 40-85% des negativen Stranges ab und variiert in seiner Größe am 3'-Ende (Beck and Nassal, 2007). Die Lücke zwischen Positiv- und Negativstrang besteht aus ungefähr 600 Nukleotiden (Summers, O'Connell and Millman, 1975). An seinem 5'-Ende hängt ein RNA-Oligomer Rest von einer Länge von ca 19 Nukleotiden, der ein Rest der prägenomischen RNA darstellt und als Primer für die Synthese des Positivstrangs dient (Beck and Nassal, 2007).

Insgesamt enthält das HBV-Genom vier sich überlappende *Open Reading Frames* (ORF), die für insgesamt sieben Proteine kodieren. Die genomische Organisation des HBV-Genoms ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Der größte Leserahmen ist der HBV-Polymerase-ORF (Pol-ORF), der 70 % des Genoms abdeckt. Er kodiert die virale Polymerase, am 5'-Ende das terminale Protein sowie am 3'-Ende die RNAseH. Die Oberflächenprotein-Domänen (S ORF), die für die drei viralen Oberflächenproteine (SHB, MHB, LHB) kodieren, überlappen sich komplett mit dem P-Gen Leserahmen. Der S ORF beinhaltet drei Domänen, die PreS1-, die PreS2 und die S-Domäne. Die Oberflächenproteine werden aus zwei verschiedenen mRNAs aus dem S-ORF translatiert. Das LHB wird aus einem 2,4 kb großen Transkript gebildet, welches sich aus den PreS1-, PreS2- und S-Domänen zusammensetzt. Das MHB und SHB werden aus einem 2,1 kb langen Transkript gebildet. Dabei setzt sich das MHB aus der PreS2- und S-Domäne zusammen, während das SHB aus der S-Domäne alleine gebildet wird (Glebe and Urban, 2007). Der Precore/Core ORF kodiert für das Kapsidprotein (Coreprotein) und das HBe-Antigen (HBeAg). Der

X-ORF kodiert für das X-Protein, das für die Transaktivierung verschiedener viraler und zellulärer Gene sowie bei der Virusreplikation und bei der Kanzerogenese der Hepatitis B eine Rolle spielt (Motavaf *et al.*, 2013).

Für die Translation der Proteine werden zwei genomische Transkripte mit jeweils einer Länge von 3,5 kb und drei subgenomische Transkripte von 2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb Länge gebildet (virale mRNAs) (Valaydon and Locarnini, 2017). Das genomische Transkript, die prägenomische RNA (pgRNA), kodiert für die HBV-Polymerase und das HBc Antigen. Sie dient auch als Template für die Replikation der viralen DNA. Ein weiteres genomisches Transkript stellt die *Precore*-RNA dar, aus der das HBeAg gebildet wird. Bei den subgenomischen Transkripten dient das 2,4 kb Transkript als Vorlage für das preS1-Protein, das 2,1 kb Transkript als Vorlage für das preS2-Protein und S-Protein und das 0,9 kb Transkript als Vorlage für die Translation des X-Proteins (Valaydon and Locarnini, 2017).

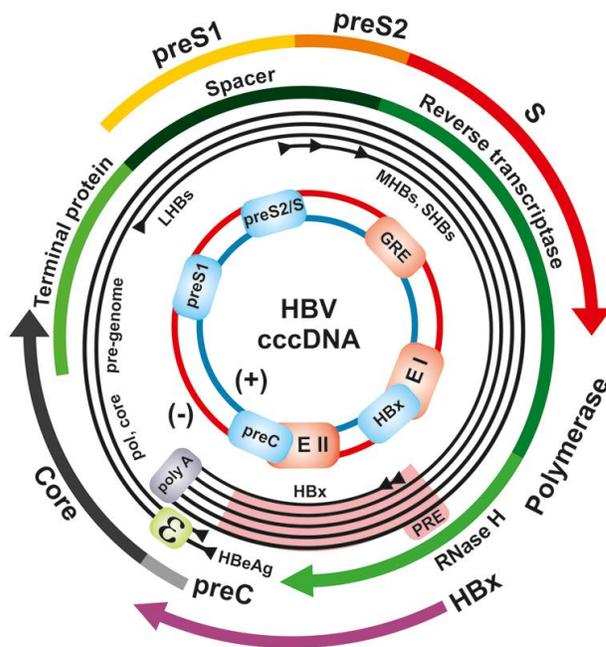


Abbildung 1.4 Genomische Organisation des Hepatitis B Virus; Darstellung der rcDNA mit den Leserahmen für die viralen Transkripte preS1, Pre S2, S, Polymerase, HBx, preC und Core (farblich als Pfeile). Die Promotoren und Enhancer E I, E II, preS1, preS2/S, HBx preC sind im inneren dargestellt. Das Epsilon-Signal ist hellgrün dargestellt und dient bei der reversen Transkription als Anlegestelle für die Polymerase. Aus Glebe D et al. Molecular virology of hepatitis b virus; Semin Liver Dis 2013; 33(02): 103-112

Zudem enthält das HBV-Genom vier Promoterregionen (preC, pre S1, pres2/S, Hbx) und zwei Enhancerregionen (Enh I und Enh II). An den 5´-Enden des Plus- wie auch des Minusstranges finden sich die *Direct-Repeat*-Regionen DR1 und DR 2, die bei Replikation der viralen rcDNA durch reverse Transkription eine wichtige Rolle spielen (Nassal, 2008). Die Überlappung der ORF führt dazu, dass einzelne Mutationen im Genom zu funktionellen Veränderungen in den korrespondierenden Proteinen führen kann.

1.2.3 Hepatitis B Virus-Proteine

Insgesamt bildet das HBV sieben virale Proteine, namentlich die virale Polymerase, die drei Oberflächenproteine SHB, MHB und LHB, das Core-Protein, das HBeAg und das X-Protein.

Die virale Polymerase hat eine Länge von ca. 850 Aminosäuren (AS), eine Größe von 90 kDa und besteht aus drei funktionellen Domänen und einer *Spacer*-Region (Seeger and Mason, 2000). Zu seinen Aufgaben gehören die Transkription prägenomischer RNA in einen DNA Minusstrang (reverse Transkriptase), den Abbau der Template RNA (RNaseH) und die Bildung eines komplementären DNA Strangs (Beck and Nassal, 2007).

Zu den funktionellen Domänen des P-Gens gehören das terminale Protein am N-terminalen Ende, welches als *Primer* zum Andocken an die prägenomische RNA bei der reversen Transkription dient. Es folgt die *Spacer*-Region, die eine strukturelle Funktion besitzt und die katalytische Domäne und das Substrat zusammenbringt. Nach dieser folgt die reverse Transkriptase Domäne (RT-Domäne), die die pgRNA in einen Minus-DNA-Strang transkribiert. Am C-terminalen Ende folgt die Rnase H-Domäne. Sie dient zum Abbau der pgRNA (Jones and Hu, 2013).

Die RT-Domäne besitzt in ihrer Tertiärstruktur große Ähnlichkeit zur reversen Transkriptase des HI-Virus (Ghany and Liang, 2007). Die Form erinnert an eine rechte Hand mit einem Daumen, vier Fingern und einer Handinnenfläche, wobei das aktive Zentrum sich im Handballen befindet (Steitz, 1999). Im aktiven Zentrum befindet sich eine hoch konservierte Aminosäuresequenz, die

gekennzeichnet ist durch zwei Asparagin Säurereste und nach der Aminosäureabfolge YMDD-Motiv (Tyrosin, Methionin, Asparaginsäure, Asparaginsäure) genannt wird (Poch *et al.*, 1989). Mutationen in diesem Motiv führen zur Selektion von Therapieresistenzen, zum Beispiel unter der Therapie mit den Nukleosidanaloga Lamivudin und Entecavir (Locarnini and Omata, 2006).

Die Hülle des HBV besteht aus drei Hüllproteinen (LHB, MHB, und SHB). Alle drei Proteine werden aus dem PreS/S ORF von drei verschiedenen Startcodons gebildet. Sie besitzen den gleichen C-Terminus, jedoch unterscheiden sich MHB und LHB von SHB durch verschiedene Verlängerungen am N-Terminus von 55 AS beim MHB durch das PreS1 und, je nach Genotyp, 107 oder 118 AS beim L-Protein, durch das PreS2 Gen. Das S-Protein besteht aus bis zu 226 AS und wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet. Es bildet sogenannte Transmembrandomänen, welche miteinander verbunden sind. Zwei dieser Transmembrandomänen werden zur Zelloberfläche hin ausgerichtet und bilden die „a“-Determinante, welche das Epitop für den Anti-HBs-Antikörper darstellt (Berting *et al.*, 1995). Die Funktion des M-Proteins ist weitestgehend unbekannt. Das L-Protein ist wichtig für das Internalisieren des Virions in die Hepatozyte (Prange, Clemen and Streeck, 1991) und bei der Umhüllung des Core-Proteins, während der Ausbildung des Virions.

Die ikosaedrische Nukleokapsidhülle wird aus dem Core-Protein gebildet, das auch HBc-Antigen (HBcAg) genannt wird und eine Größe von 22 kDa hat mit 183 AS Länge. Neben seiner Funktion als Kapsidprotein kann das HBcAg durch Phosphorylierung verschiedene Funktionen beim Verpacken und Verbinden mit der pgRNA erfüllen (Mak *et al.*, 2017).

Aus dem PreCore/Core-Protein wird das HBeAg gebildet. Es besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie das HBcAg, der jedoch noch ein Signalpeptid voransteht. Damit kann das Protein in das endoplasmatische Retikulum integriert werden, wo es nach Abspaltung des *basic c-terminal* aus der Zelle als HBeAg sekretiert werden kann (Ito *et al.*, 2009)(Messageot *et al.*, 2003). Die Funktion des HBeAg ist weitgehend unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass es eine

Rolle bei der Immunabwehr als Immunmodulator und Tolerogen besitzt (Chen *et al.*, 2005). In der Diagnostik wird das HBeAg als Marker einer chronisch aktiven Hepatitis B eingesetzt.

Das X-Protein wird aus dem X-ORF abgelesen und ist phylogenetisch bedeutend jünger als die anderen ORFs. Seine genaue Funktion ist noch nicht ausreichend aufgedeckt. Ihm wird eine Rolle bei der Transaktivierung verschiedener viraler und zellulärer Gene zugeschrieben und durch den daraus resultierenden Einfluss auf das Zellwachstum eine karzinogene Funktion (Xu *et al.*, 2014). Zellexperimentell konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die zellulären *Enhancer*/Promotoren wahrscheinlich durch Protein-Protein Interaktion vermittelt ist. So konnte sowohl ein Einfluss auf nukleäre Transkriptionsfaktoren, als auch auf Proteine von Signaltransduktionskaskaden wie Src Kinase, Jak1/STAT, Protein Kinase C, Ras/Raf/MAP Kinase gezeigt werden (Kew, 2011). Ausserdem hat es Einfluss auf die Proteasomfunktion und somit auf den Abbau verschiedener zellulärer und viraler Proteine (Wei *et al.*, 2010).

1.2.4 Der Hepatitis B Virus-Lebenszyklus

Durch Mutationsanalysen konnte die PreS-Domäne des L-Oberflächenproteins als viraler Anteil für eine Rezeptorbindung an der Hepatozyte bestimmt werden. Nach einer unspezifischen Anbindung des Virus an zelluläre Heparansulfat-Proteoglykane im Dissereaum (Schulze, Gripon and Urban, 2007) erfolgt danach eine irreversible Bindung des am N-Terminal myristillierten L-Proteins (LHB) an das Natriumtaurochlorat kotransportierendes Polypeptid (NTCP). Danach gelangt das Virus via Endozytose und anschliessende zytosolische Freisetzung des Nukleokapsids in das Zellinnere ((Yan *et al.*, 2012); Ni Y *et al.* 2014). Nach der Aufnahme des Virus in das Zytosol erfolgt die Freisetzung der Nukleokapside (*Uncoating*). Danach werden die Nukleokapside über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Rabe *et al.*, 2003). Die innerhalb des Kapsids befindliche relaxiert zirkuläre doppelsträngige DNA (rcDNA) wird dann aktiv zum Nukleus transportiert, wo sie freigesetzt wird. Dort wird das Kapsid über das *nuclear core protein* Nup 153 aufgelöst und die im Kapsid befindliche rcDNA kann in das

innere des Nukleus transportiert werden (Schmitz *et al.*, 2010). Im Nukleus wird durch zelluläre Enzyme aus der offenen Form des Genoms durch Komplettierung des Plusstrangs und Lösung der Bindung der viralen Polymerase eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA gebildet (*covariantly, closed, circular DNA, cccDNA*), welche nicht in in das zelluläre Genom integriert wird. Die cccDNA bildet mit zellulären Histonen und nicht Histonproteinen Nukleosomen sogenannte Minichromosomen und befindet sich in interchromosomalen Territorien ((Bock *et al.*, 1994), (Bock *et al.*, 2001)). Sie dient als Matrize für die Transkription der viralen RNA und Translation viraler Proteine. Die persistierenden cccDNA-Moleküle sind für die Reaktivierung der Replikation und Wiederauftreten der Hepatitis bei chronischen Hepatitis B Patienten verantwortlich.

HBV-Genome können zudem in das zelluläre Chromatin integriert werden. Dies kann zu insertionellen Mutationen führen, die eine Entartung der Zelle zur Folge haben kann. Eine Integrationsstelle der viralen DNA in das Wirtsgenom ist in der Umgebung des humanen Telomerase reverse Transkriptase Gens (hTERT) häufiger zu beobachten (Valaydon and Locarnini, 2017) .

Die Transkription des viralen Genoms erfolgt im Zellnukleus mithilfe der zellulären RNA-Polymerase II. Dabei werden zwei genomische und drei subgenomische RNA-Transkripte generiert, die ins Zytosol gelangen und die Translation der viralen Proteine einleiten. Aus der 3,5kb langen pgRNA werden die virale Polymerase und die HBV-Core-Proteine gebildet. Aus der 3,5 kb langen *Prcore*-RNA wird das HBeAg gebildet, welches für die Ausbildung der chronischen HBV-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Aus den subgenomischen Transkripte werden die restlichen HBV-Proteine gebildet (Kap.1.2.3).

Die pgRNA dient bei der reversen Transkription als Vorlage für die Replikation der viralen DNA. Dies geschieht durch die Anlagerung des P-Proteins an die pgRNA an einem Stamm-Schleifen-Motiv (Epsilon-signal) ((Junker-Niepmann, Bartenschlager and Schaller, 1990)(Knaus and Nassal, 1993)). Danach erfolgt der Einbau in das aus den *Core*-Proteinen neu gebildete unreife Kapsid zusammen mit einer Proteinkinase (Kann and Gerlich, 1994). Im Kapsid

generiert dann die HBV reverse Transkriptase den viralen DNA-Minusstrang unter gleichzeitigem Abbau des RNA-Templates. Danach wird der Plusstrang komplementär zum Minusstrang gebildet mittels der HBV-Polymerase (Beck and Nassal, 2007). Der Lebenszyklus ist in Abbildung 1.5 grafisch dargestellt.

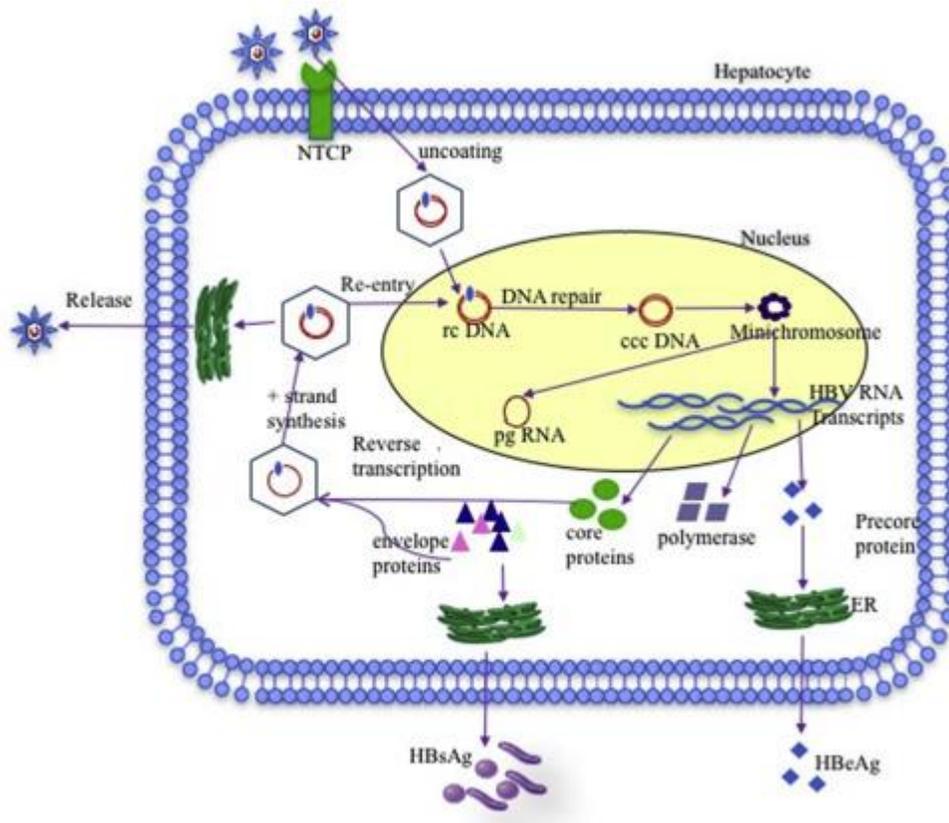


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Lebenszyklus vom HBV. Das Virion dringt nach Bindung an das *hepatocyte receptor sodium taurocholate cotransporting protein* (NTCP) in die Hepatozyte ein. Im Zytosol erfolgt die Freisetzung der viralen relaxiert zirkulären DNA (rcDNA) aus dem Kapsid, welche dann in den Zellkern gelangt und dort in eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) umgewandelt wird und als Minichromosom im Zellkern vorliegt. Die HBV-Minichromosomen dienen als Vorlage für die HBV-RNA-Transkripte und die prägenomische RNA. Aus den viralen Transkripten wird das Präcore-Protein gebildet, aus dem im endoplasmatischen Retikulum das HBeAg gebildet wird und dann sezerniert wird. Weiterhin werden die virale Polymerase, das Coreprotein und die Oberflächenproteine gebildet. Im Zytosol erfolgt die Bildung der Kapside, in denen auch die reverse Transkription der viralen DNA durch Anbindung der HBV-Polymerase an die prägenomische RNA erfolgt. Die Kapside werden in intrazellulären Membranen, der *endosomal sorting complexes required for transport machinery* (ESCRT) mit den Oberflächenantigenen bestückt und über das ER sezerniert. Ebenfalls im ER werden aus den Oberflächenproteine subvirale Partikel gebildet und sezerniert. Die Abbildung wurde entnommen aus (Valaydon and Locarnini, 2017)

Die neu gebildeten Kapside werden auf zwei Arten weiterverarbeitet. Der Grossteil wird nach Dephosphorylierung der *Core*-Proteine in intrazellulären Membranen, der *endosomal sorting complexes required for transport machinery (ESCRT)* (Lambert, Döring and Prange, 2007)(Watanabe *et al.*, 2007) mit den Oberflächenproteinen bestückt und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als reifendes Virion eingelagert, von wo es aus den Hepatozyten sezerniert werden kann. Unabhängig werden im ER und Golgi-Apparat subvirale Partikel gebildet und aus der Hepatozyte sezerniert (Patient *et al.*, 2007)(Huovila, Eder and Fuller, 1992). Ein anderer Teil der Kapside gelangt wieder in den Zellkern, wo die DNA als Vorlage für die Synthese weiterer cccDNA dient (Levrero *et al.*, 2009).

1.2.5 Immunpathogenese der Hepatitis B Infektion

Ein Charakteristikum viraler Hepatitiden ist, dass nicht primär das Virus schädigend auf die Zelle wirkt, sondern die Immunantwort des Wirts vor allem durch zytotoxische T-Zellen, die gegen die von den Hepatozyten präsentierten viralen Antigene gerichtet sind.

Nachdem das Virus erfolgreich in die Hepatozyte eingedrungen ist, repliziert es über viele Wochen auf niedrigem Niveau. Danach steigt die Virusreplikation rapide an was vor allem eine Antwort des angeborenen Immunsystems zur Folge hat. Virus-DNA und RNA werden in der infizierten Hepatozyte durch zytosolische und Toll Like Rezeptoren (TLR) erkannt und induzieren die Bildung von Interferon- (IFN) α und β , die die Produktion von neuen Virionen unterdrücken (Sandhu *et al.*, 2017). Das HBV hat jedoch verschiedene Strategien entwickelt um sich den Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunantwort zu entziehen (Wieland and Chisari, 2005). Ein weiterer Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen). Sie produzieren Interferon γ , welches die virale Replikation hemmt (Schuch, Hoh and Thimme, 2014).

Weiterhin wird mit den dendritischen Zellen eine weitere Zellreihe des natürlichen Immunsystems aktiviert, die ebenso IFN α sezerniert und dadurch natürliche Killerzellen aktiviert, die wiederum die infizierten Zellen lysieren können. Die

dendritischen Zellen präsentieren virale Antigene an ihrer Membranoberfläche in Lymphknoten T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen und kostimulieren dadurch eine Antigen-spezifische Immunantwort. Bei der selbstlimitierenden Hepatitis-B-Infektion spielen zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen eine essentielle Rolle bei der Eliminierung von HBV. Die zytotoxischen T-Zellen wandern in die Leber ein und lösen zum einen durch Bindung an den FAS-Liganden die Apoptose in der Hepatozyte aus, nachdem diese über MHC-I virale Antigene präsentiert hat. Dies geschieht über Zytokine und Perforine (Lee *et al.*, 1997). Ein wesentlich wichtigerer Vorgang ist die Sekretion von IFN γ , welches in der Hepatozyte dazu führt, dass die HBV Genexpression und Virusreplikation in einem Kinase- und Proteasom-abhängigen Prozess gehemmt wird (Chisari, Isogawa and Wieland, 2010). T-Helferzellen spielen in der Frühphase der Infektion eine essentielle Rolle, indem sie die Immunantwort durch die zytotoxischen T-Zellen induzieren. Dabei scheint die Menge des viralen Inokulums eine Rolle zu spielen, wie schnell die T-Helferzellen die Einwanderung zytotoxischer T-Zellen in die Leber induzieren können. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit geringeren Mengen von HBV-Inokulum eine verzögerte T-Zellreaktion mit der Ausbildung einer Viruspersistenz hervorrief, während Infektionen mit hohen Mengen viraler Partikel eine suffiziente Eliminierung des Virus aus den Hepatozyten verursachte (Asabe *et al.*, 2009).

Die humorale Immunantwort erfolgt durch aktivierte B-Zellen, die nach Antigenpräsentation in die Milz und ins Knochenmark wandern, um dort monoklonale B-Zellen Antikörper gegen virale Proteine zu bilden. Vor allem anti-HBs-Antikörper spielen bei der Neutralisierung freier HBV-Partikel eine essentielle Rolle und verhindern den Eintritt des Virus in die Hepatozyte. Die Chronifizierung der Hepatitis B, die bei 5% der Infektionen beim Erwachsenen auftritt, ist wahrscheinlich eine Folge einer insuffizienten T-Zellfunktion.

Dabei spielen die immunmodulierende Funktion viraler Antigene, vor allem von HBeAg, die Hochregulierung von kostimulierenden T-Zell-Rezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 durch virale Antigene eine Rolle. Sie beeinflussen die T-Zell-

Effektorfunktion und die Eliminierung der zytotoxischen T-Zellen durch natürliche Killerzellen durch zum Beispiel den TRAIL-Mechanismus (Chang and Liu, 2016).

1.3. Klinischer Verlauf der HBV-Infektion

1.3.1 Infektionsweg

Die Infektion mit dem HBV erfolgt durch sexuellen Kontakt, durch perinatale Infektion, auf parenteralem Wege bei Bluttransfusionen und durch *needle sharing* bei intravenösem Drogenabusus. In niedrig-Prävalenz-Gebieten, zum Beispiel Deutschland, erfolgt die Infektion am häufigsten auf sexuellem Wege. Weiterhin sind die Infektion durch *needle-sharing* häufig. In Ländern mit mittlerer Prävalenz, zum Beispiel im nahen Osten, erfolgt ein Großteil der Infektionen durch horizontale Infektion im Kindesalter. In Hochprävalenzgebieten, wie Subsahara Afrika, erfolgt die Infektion meistens perinatal *in utero*. Durch vorgeburtliche Reduktion der Viruslast bei der Mutter und einer passiven und anschließenden aktiven Immunisierung des Neugeborenen kann die Infektionsrate von bis zu 90% dramatisch gesenkt werden (C. Lee *et al.*, 2006).

1.3.2 Die Akute Hepatitis-B-Infektion

Die Inkubationszeit einer Hepatitis-B-Infektion beträgt 45 bis 180 Tage. Nach einer Infektion mit dem HBV kann es in der Prodromalphase zu uncharakteristischen Beschwerden wie Fieber, Myalgien, Arthralgien, Übelkeit, Erbrechen, Inappetenz und Oberbauchbeschwerden kommen. Nach einer Inkubationszeit von ein bis vier Monaten kommt es bei 30% zu einer akuten, manifesten, ikterischen Hepatitis, während 70% eine klinisch stumme oder subklinische Infektion durchlaufen und ausheilen. Die klinischen Symptome einer ikterischen Hepatitis sind Leberdruckschmerz durch Hepatomegalie, Gelbfärbung der Konjunktiven sowie der Haut mit begleitendem Juckreiz sowie die Entfärbung des Stuhls. Bei 0,5-1% nimmt die Infektion einen fulminanten Verlauf, der lebensbedrohlich sein kann. Nach Abklingen der akuten Hepatitis ist bei einigen Patienten eine lebenslange cccDNA Persistenz mit latenter T-Zellantwort

beschrieben (Yotsuyanagi *et al.*, 1998). Hier besteht ein hohes Risiko einer Reaktivierung der Infektion bei Immunsuppression.

1.3.3 Die chronische HBV Infektion

Während der überwiegende Großteil der Infektionen im Erwachsenenalter ausheilt, entwickelt sich bei 5% aller HBV-Infizierten eine Viruspersistenz, die über das Vorhandensein des HBsAg bestimmt wird. Besteht diese über sechs Monate sind die Kriterien einer CHB-Infektion erfüllt. Bei Neugeborenen liegt die Rate bei 90%, in der Gruppe der ein- bis fünfjährigen bei 20-25% (Livingston *et al.*, 2007).

Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch und es ging auch kein akuter Verlauf voran. Die klinischen Symptome sind eher unspezifisch und äußern sich in Abgeschlagenheit und Müdigkeit. Erst durch die Entwicklung einer Leberzirrhose und Progression zu einem hepatozellulären Karzinom treten Symptome einer Leberfunktionsstörung wie Ikterus und Pruritus, Aszites Blutgerinnungsstörung und schließlich eine hepatische Enzephalopathie in Erscheinung. Weiterhin kommt es in seltenen Fällen zu extrahepatischen Manifestationen mit Immunkomplexerkrankungen wie Panarteriitis nodosa, membranöser und membranoproliferativer Glomerulonephritis, sowie Guillain-Barré-Syndrom.

Die chronische Hepatitis kann in ihrem Verlauf in fünf verschiedene Typen unterteilt werden (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Die "immuntolerante" Form ist typisch für Infektionen im perinatalen Alter durch mangelnde Ausreifung des Immunsystems. Die Replikationsrate des Virus ist überwiegend sehr hoch, weswegen die Infizierten hoch ansteckend sind. Diagnostisch finden sich entsprechend hohe HBV-DNA-Werte und das Vorhandensein von HBeAg. Wegen einer insuffizienten Immunantwort ist die Entzündungsreaktion der Leber sowie einer Leberzirrhose gering, was sich durch niedrige Transaminasen widerspiegelt. Jedoch ist die Rate an Serokonversionen

mit Verlust des HBsAg ebenfalls gering (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Nach einer Dauer von 10-30 Jahren kann diese Form in eine "immunreaktive" Form mit fortschreitender Entzündung der Leber übergehen.

Die "immunreaktive, HBeAg positive" Form verläuft über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis einigen Jahren und zeigt eine deutliche Entzündungsreaktion der Leber mit einer fibrotischen Umwandlung des Lebergewebes bis hin zu einem erhöhten Risiko zur Ausbildung einer Leberzirrhose und eines HCC. Das HBeAg ist positiv die Transaminasen sind etwa um das zweifache des Normalwertes erhöht und es finden sich erhöhte HBV-DNA-Werte über mindestens 2000 IE/ml. Eine spontane Serokonversion erfolgt häufig. Sie liegt bei Erwachsenen bei 12 % pro Jahr (Terrault *et al.*, 2015).

Die "immunreaktive, HBeAg negative" Form entsteht im späteren Verlauf einer CHB durch Ausbildung von Quasispezies mit Nukleotidsubstitutionen in der *Precore* und /oder der basalen *Core*-Promotorerregion, was zu einer verminderten oder sogar aufgehobenen Expression des HBeAg führt. Sie wird häufiger bei CHB-Verläufen nach HBeAg-Serokonversion mit anhaltend erhöhter Viruslast oder bei Reaktivierung einer Inflammation bei Patienten mit inaktivem HBV-Trägerstatus beobachtet. Durch ein negatives HBeAg im Serum sind diese Erkrankten schwer von denen mit inaktivem HBV-Trägerstatus zu unterscheiden. Der klinische Verlauf ist fluktuierend und zeigt Phasen einer Reaktivierung der Infektion mit korrespondierend erhöhter HBV-DNA und Transaminasen. Dadurch kann es zu einem fortschreitenden fibrotischen und zirrhotischen Umbau des Lebergewebes und einem erhöhtem Risiko Komplikationen der CHB zu entwickeln, kommen (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Der „inaktive HBsAg-Trägerstatus“ ist Zeichen einer erfolgreichen immunologischen Kontrolle der Infektion. Die Virus DNA ist im Serum nur noch gering oder gar nicht mehr nachweisbar und es erfolgt eine Serokonversion des HBeAg. Die Prognose ist bei geringem Risiko für die Entwicklung einer Zirrhose oder eines HCC günstig (Tai *et al.*, 2009). Im weiteren Verlauf kann es auch zu

einer Reaktivierung der Infektion kommen, weswegen ein weiteres Monitoring dieser Patienten notwendig ist.

Bei der „HBsAg negativen Phase“ handelt es sich hierbei um die Spätphase der chronischen HBV-Infektion. Anti-HBc-AK mit oder ohne anti-HBs-AK können im Serum detektiert werden. Nach dem Verlust des HBsAg kann im Serum normalerweise keine HBV-DNA mehr detektiert werden. Bei Erlangen dieses Status vor Ausbildung einer Leberzirrhose kann von einer Verbesserung der Prognose mit niedrigerem Risiko weiterer Komplikationen ausgegangen werden (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

1.4 Therapie der chronischen Hepatitis B

Das Therapieziel der chronischen Hepatitis B ist die Verbesserung der Lebensqualität und des Überlebens der Patienten, da nach aktuellen Therapiestandards eine kurative Therapie nicht möglich ist. Dies bewirkt man durch Suppression der entzündlichen Aktivität in der Leber und den daraus resultierenden Komplikationen, wie dekompenzierte Leberzirrhose und die Entwicklung eines HCC (Scaglione and Lok, 2012). Die in der Therapie der CHB eingesetzten Pharmaka unterdrücken in erster Linie die virale Replikation in der Leberzelle, welche eine Reduktion der entzündlichen Aktivität bewirkt. Eine vollständige Erradikation des Virus ist durch die Persistenz von cccDNA in den Zellkernen infizierter Hepatozyten nicht möglich (Werle-Lapostolle *et al.*, 2004). Ein idealer Endpunkt der Therapie ist das Erlangen einer anhaltenden HBsAg-Serokonversion nach Beendigung der antiviralen Therapie. Dies ist aber nur in den wenigsten Fällen erreichbar. Deswegen wird durch die Therapie bei HBeAg positiven Patienten eine HBeAg-Serokonversion angestrebt. Falls dies nicht erreichbar ist, wird eine anhaltende Suppression der Viruslast unter die Nachweisgrenze unter antiviraler Therapie bei HBeAg positiven und negativen Patienten angestrebt (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Eine Therapieindikation besteht nicht bei allen CHB-Infektionen und leitet sich neben Faktoren wie der viralen Aktivität, der Höhe der Transaminasen und der

histologischen Veränderung in der Leber auch von vielen Nebenfaktoren wie Alter, männlichem Geschlecht, Alkoholabusus, einer positiven Familienanamnese für HCC, Diabetes mellitus, dem HBV-Genotyp oder einer Koinfektion mit Hepatitis C oder D sowie HIV ab (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012). Es besteht in den Leitlinien aller führenden Fachgesellschaften Einigkeit darüber, dass bei Patienten mit einer Leberzirrhose eine Therapieindikation besteht. Auf der anderen Seite gibt es in der Regel keine Therapieindikation bei Patienten in der immuntoleranten Phase und einem Alter <30 Jahren, da bei diesen Patienten biopsische Studien keine relevante entzündliche Aktivität im Lebergewebe gezeigt haben und Therapiestudien keine wesentlichen Vorteile bezüglich einer HBeAg-Serokonversion oder eines HBsAg-Verlustes gezeigt haben. Hier wird eine 3-6-monatige Kontrolle, ob ein Übergang in eine immunreaktive Form eingetreten ist, empfohlen (Ghany, 2017).

Bei Patienten mit positivem und negativem HBeAg-Status ohne Leberzirrhose ist eine Therapie indiziert, bei einer HBV-Last >20000IE/ml und einer ALT-Erhöhung über zweifachen des Normalwertes (Männer >100E/l, Frauen > 70E/l). Eine Leberbiopsie ist dafür nicht unbedingt notwendig. (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Bei HBeAg negativen Patienten mit einer Viruslast >2000 und <20000 IE/ml und normalen ALT-Werten und fehlendem Nachweis einer entzündlichen Aktivität oder fibrotischen Umbaus in der Leberbiopsie ist keine Therapie notwendig. Bei diesen Patienten sollten die ALT-Werte alle 3-6 Monate kontrolliert werden (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012).

Verglichen zu keiner Therapie konnte in einer Metanalyse gezeigt werden, dass mit einer geringen bis moderaten Evidenz eine antivirale Therapie signifikant das Risiko HBV-bedingter Komplikationen wie Leberzirrhose oder bei einer Patientenkohorte mit fortgeschrittener Leberfibrose oder Zirrhose HCC senken konnte (Lok *et al.*, 2016).

Zur pharmakologischen Therapie sind insgesamt acht Medikamente in Deutschland zugelassen, wobei man grundsätzlich zwischen zwei Medikamentengruppen unterscheidet, dem IFN α sowie seiner pegylierten Form

und den Nukleosid-/ Nukleotidanaloga (NUC). Als Erstlinientherapie werden von allen führenden Fachgesellschaften (AASLD, EASL und APASL) entweder die Monotherapie mit Entecavir oder Tenofovir oder die Therapie mit PEG-Interferon (Peg-IFN) empfohlen. Bezüglich der Wahl, welches Medikament zur Therapie eingesetzt werden soll, spielen verschiedene individuelle und prognostische, Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel Komorbiditäten, die mit dem Patienten diskutiert werden müssen ((Terrault *et al.*, 2015)(EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012)(Sarin *et al.*, 2016)).

1.4.1 Interferon- α

Die im Körper natürlich vorkommenden Interferone (IFN) haben wichtige immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften. Durch Hemmung der viralen Translation sowie durch direkte Hemmung der viralen Transkription entfaltet IFN α seine antivirale Wirkung. Weiterhin wirkt es durch Einfluss auf Zellzyklus regulierende Proteine negativ auf die Proliferation der Wirtszelle aus und kann die Apoptose infizierter Zellen induzieren (Boasso A, Scientifica 2013; Stetson DB, Immunity 2006).

Das therapeutisch eingesetzte IFN α -2a liegt in zwei Formen vor, das konventionelle Interferon IFN α -2a und das pegylierte IFN α -2a (Peg-IFN α -2a), welches nur einmal in der Woche durch subkutane Injektion appliziert werden muss. Peg-IFN α -2a hat inzwischen das konventionelle IFN α -2a als Standardtherapeutikum ersetzt. Kontraindikationen für eine IFN α -2a-Therapie bestehen bei einer HBV induzierten dekompensierten Leberzirrhose, bei Leukozyto- und Thrombozytopenien sowie bei bestehenden Autoimmunerkrankungen und bei unkontrollierbaren depressiven Störungen oder Psychosen. Durch eine IFN α -Therapie konnten in Studien HBeAg-Serokonversionsraten von bis zu 32% und ein HBsAg-Verlust in 3% der Patienten erzielt werden (Lau *et al.*, 2005). Bei 5-10% der Patienten, bei denen eine HBeAg-Serokonversion erreicht werden konnte, kann es im Verlauf der Hepatitis B zu einer Reaktivierung der Infektion kommen (Wang L J Immun Methods 2014).

Ein virologisches Ansprechen der Therapie besteht bei einer Reduktion der HBV-DNA-Serumkonzentration unter 2000 IE/ml nach 24-wöchiger Therapie. Nach serologischen Kriterien definiert man den Therapieerfolg als das Erreichen einer anhaltenden HBeAg-Serokonversion mit Normalisierung der Transaminasen und einer Senkung der Viruslast <2000 IU/ml oder idealerweise unter die Nachweisgrenze bei HBeAg positiven Patienten. Nach Beendigung der IFN α -Therapie und Erreichen einer HBeAg-Serokonversion sollte HBe- und HBsAg Kontrolle alle 12 Monate erfolgen. Der Vorteil eines Therapieversuchs mit IFN α liegt in der begrenzten Therapiedauer von 48 Wochen und der relativ hohen Wahrscheinlichkeit einer HBeAg- und HBsAg-Serokonversion. Zudem sind keine Resistenzentwicklungen gegen IFN α bekannt. Ein Problem für eine ausreichende Adhärenz stellen das Nebenwirkungsprofil und die subkutane Applikation dar.

Günstige Prognosefaktoren einer IFN α -Therapie sind eine vor Therapiebeginn eine niedrige Viruslast (unter 10^8 IE/ml), erhöhte Serum ALT-Werte über das 2-5-fache des Normwertes und eine hohe entzündliche Aktivität in der Leberhistologie. Der Genotyp des Virus gibt ebenfalls Aufschluss über den Erfolg einer IFN-Therapie, wobei Genotyp A und B mit einer günstigeren Prognose einhergehen. Im Allgemeinen wird die Interferontherapie besser von jüngeren Patienten vertragen, als von älteren.

1.4.2 Nukleosid-/ Nukleotidanaloga

Für die Therapie der CHB sind aktuell sechs Nukleosid-/ Nukleotidanaloga (NUC) Präparate zugelassen, Lamivudin (LAM), Adefovir (ADV), Tenofovir (TNV), Telbivudin (TLV) und Entecavir (ETV). Im Januar 2017 wurde Tenofovir Alafenamide als neuestes Präparat in Europa zugelassen. Anhand ihrer chemischen Struktur lassen sie sich in drei Klassen unterteilen: die L-Nukleosidanaloga, zu denen Lamivudin und Telbivudin gehören, eine zweite Klasse von Nukleosidanaloga mit einem Zyklopentan-Zuckerrest, zu denen Entecavir gehört und die Nukleotidanaloga, zu denen Adefovir und Tenofovir gehören.

NUC hemmen die virale Polymerase- und reverse Transkriptaseaktivität. Dies geschieht entweder durch Hemmung des *Primings* bei der Synthese des kurzen DNA Minusstrangs, der Hemmung der reversen Transkription von der pgRNA, oder der Hemmung der DNA-abhängigen DNA Replikation (Yuan HJ et al 2007). Im Gegensatz zur Therapie mit IFN α -2a kann eine Therapie mit NUC bei unzufriedenem virologischem Ansprechen oder HBe-Ag negativen Patienten von unbegrenzter Dauer sein.

Die Vorteile einer NUC Therapie sind die orale Applizierbarkeit, ein moderates Nebenwirkungsprofil sowie vor allem seine starke antivirale Wirkung. Außerdem besteht sowohl ein stärkerer Effekt auf die Normalisierung der ALT-Werte, als auch auf die Senkung der entzündlichen und fibrotischen Aktivität in der Leber. Einflüsse des Genotyps auf das Ansprechen auf eine antivirale Therapie mit NUC sind nicht bekannt (Wiegand 2008 antiviral therapy).

Prognostisch gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Therapie sind eine geringe Viruslast und 2×10^8 IE/ml, hohe Serum ALT-Werte und eine hohe entzündliche Aktivität in der Leber. Prinzipiell ist eine begrenzte Therapie mit NUC möglich, wenn eine HBeAg-Serokonversion erreicht werden kann. Die EASL empfiehlt nach Erreichen einer HBeAg-Serokonversion die Therapie für weitere 12 Monate fortzusetzen. Hier haben Studien gezeigt, dass eine Persistenz der HBeAg-Serokonversion in 40-50% zu erreichen ist (Chang *et al.*, 2010). Eine unbegrenzte Therapie mit NUC ist bei Nichterreichen einer HBeAg-Serokonversion oder ausreichender Senkung der Viruslast und grundsätzlich bei Patienten mit zusätzlich bestehender Leberzirrhose angezeigt.

Adefovir Dipivoxil (Hepsera®) ist seit 2003 zugelassen. Die empfohlene Tagesdosis ist 10 mg pro Tag. Die wichtigste Nebenwirkung einer ADV-Behandlung stellt seine Nephrotoxizität, insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion dar. In einer Phase III Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer HBeAg positiven CHB nach fünf Jahren Therapie mit 10 mg ADV eine Verbesserung der Nekroinflammation und Fibrose der Leber in 60% und ein HBeAg-Verlust und eine HBe- Serokonversion in 58% bzw. 48% erreicht werden konnte (Marcellin, Chang, *et al.*, 2008).

In einer anderen Phase III Studie mit ADV, die Patienten mit einer HBeAg negativen CHB einschloss, konnte nach einer 48-wöchigen Therapie mit 10 mg ADV gezeigt werden, dass im Vergleich zu einem Placebo die Behandlung zu einem signifikanten Rückgang der entzündlichen Aktivität in der Leber bei 61%, einer Senkung der Viruslast <400 Kopien/ml bei 51% und bei 72% der Patienten zu einer Normalisierung der ALT-Werte führt (Hadziyannis *et al.*, 2006). Bei Patienten, die unter LAM eine Therapieresistenz entwickelt hatten, konnte eine Therapie mit ADV einen stärkeren Rückgang der Viruslast erzielen, als mit einer Alternativtherapie mit ETV (Chung *et al.*, 2011).

TNV (Viread®) wurde 2008 für die Therapie der CHB zugelassen. Die Tagesdosis beträgt 300 mg pro Tag. Im Vergleich zu ADV konnte in einer randomisierten kontrollierten Studie (RCT) mit HBeAg positiven CHB-Patienten eine höhere Senkung der Viruslast < 400 Kopien/ml bei 76 % mit TNV im Gegensatz zu 13% mit ADV erreicht werden. Eine Vergleichsstudie bei HBeAg negativen Patienten konnte ebenfalls zeigen, dass signifikant bei mehr Patienten unter TNV (93%) eine Senkung der Viruslast <400 Kopien/ml erreicht wird, als mit ADV (63%) (Marcellin, Heathcote, *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu ADV wurden bei TNV bisher keine Therapieresistenzen beschrieben (Snow-Lampart *et al.*, 2011) (Siehe Kapitel 1.5.2). In Leitlinien wird aufgrund der höheren antiviralen Potenz und des günstigeren Resistenzprofils empfohlen, dass TNV als Nukleotidanalogen ADV vorzuziehen ist. ADV sollte nur eingesetzt werden, wenn die Erstlinientherapeutika TNV und ETV nicht verfügbar sind (Ghany, 2017).

Ein großes Problem stellt bei längerfristiger Therapie mit NUC die Selektion von antiviralen Resistenzmutationen dar, die zu einem verschlechterten Ansprechen bis zu einem Therapieversagen führen können. Außerdem ist die Serokonversionsrate sowohl für HBeAg, als auch HBsAg im Vergleich zu IFN α geringer.

Beim Therapieversagen unter NUC-Therapie wird zwischen einem primären Nichtansprechen, einem teilweisem virologischen Nichtansprechen und einem sekundärem Therapieversagen unterschieden. Das primäre Nichtansprechen ist

definiert als eine Senkung der viralen DNA $< 1 \log \text{ IE/ml}$ 3 Monate nach Therapiebeginn. Ein häufiger Grund hierfür ist eine schlechte Adhärenz des Patienten (Berg T, Zoulim 2010). Das primäre Nichtansprechen tritt besonders bei mit LAM-vortherafierten Patienten unter der Therapie mit ADV auf, mit Raten bis zu 20% (Y. S. Lee *et al.*, 2006). Bei einem teilweisen virologischen Ansprechen zeigt sich nach einer 6-monatigen antiviralen Therapie eine Senkung der Viruslast $>1 \log \text{ IE/ml}$, jedoch keine Senkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze. Hierfür ist ebenfalls eine schlechte Adhärenz häufig die Ursache. Neben Sicherstellung dieser empfehlen die Leitlinien (AASLD, EASL) eine Umstellung der NUC-Therapie auf ein potenteres Präparat, oder bei einer Therapie mit TNV oder ETV, entweder die Fortführung der Monotherapie, da eine Resistenzbildung bei diesen Medikamenten mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist, oder die Ergänzung der Therapie mit dem jeweilig anderen Medikament.

Das sekundäre Nichtansprechen ist definiert als ein Wiederanstieg der Viruslast $>1 \log \text{ IE/ml}$, im Vergleich zum niedrigsten gemessenen Wert. Ihm folgt häufig ein Wiederanstieg der ALT-Werte. Neben einer schlechten Adhärenz spielt hier vor allem die Selektion von Resistenzmutationen eine wichtige Rolle. Je nach eingesetztem Medikament wird empfohlen auf ein potenteres Präparat umzusteigen, welches keine Kreuzresistenz besitzt (Zoulim and Durantel, 2015). Sollte ein sekundäres Versagen unter TNV oder ETV Monotherapie einsetzen, sollte eine Umstellung auf, oder eine Ergänzung mit dem anderen Präparat erfolgen (AASLD Guidelines 2016).

1.5.1 Mutationen und Ausbildung von Therapieresistenzen

Die Ausbildung von Mutationen beim HBV wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Ein wesentlicher Faktor dazu ist, dass die reverse Transkriptase keine *Proof-Reading* Funktion besitzt. Dies führt dazu, dass falsch eingebaute Nukleotide bei der DNA-Synthese nicht erkannt und ausgetauscht werden und Punktmutationen leichter entstehen können. Die Mutationsrate eines

Replikationszyklus wird auf 10^{-5} /Base/Zellzyklus geschätzt ((Girones and Miller, 1989)). Sie ist ungefähr 10mal höher als in anderen DNA Viren.

Weiterhin weist das HBV sehr hohe Replikationsraten mit bis zu 10^{12} Virionen/Tag auf ((Nowak *et al.*, 1996)). Die Kombination aus hoher Replikationsrate und hoher Nukleotidsubstitutionsrate hat zur Konsequenz, dass in einem infizierten Patienten pro Tag ca. 10^{10} - 10^{11} Punktmutationen entstehen können. Betrachtet man die Genomlänge des HBV von 3200 bp könnte somit statistisch an einem Tag jede einzelne Base ausgetauscht werden ((Locarnini *et al.*, 2004). In einem infizierten Patienten muss also davon ausgegangen werden, dass die Viruspopulation aus mehreren sich in mindestens einer Nukleotidbase unterscheidenden Quasispezies besteht (Domingo, 2003). Diese Quasispezies unterscheiden sich in ihren replikativen Eigenschaften unter einem natürlichen Selektionsdruck, welche replikative Fitness genannt wird (Richman, 2000). Ohne zusätzlichen Selektionsdruck durch eine antivirale Therapie dominiert normalerweise der Wildtyp, welcher die beste replikative Fitness besitzt gegenüber den anderen Quasispezies in der Viruspopulation (Müller C, 2009).

Durch die Bildung von cccDNA während des Replikationszyklus können die Mutationen intrazellulär persistieren und als Quelle für eine Reaktivierung der Virusreplikation und Infektiosität dienen. Dies wird begünstigt durch die lange Halbwertszeit der cccDNA von bis zu 30 Tagen (Moraleda *et al.*, 1997), als auch der langen Halbwertszeit der infizierten Hepatozyten, die je nach entzündlicher Aktivität zwischen 30-100 Tagen betragen kann (Lewin *et al.*, 2001).

Während ein Großteil der Mutationen klinisch unbedeutend bleibt, haben vor allem Mutationen, die durch den Selektionsdruck durch Vakzination und antiviraler Therapie entstehen, eine bedeutende klinische Relevanz. Die Entwicklung von Therapieresistenzen hängt im Wesentlichen von der Effektivität der antiviralen Aktivität des NUC ab und dem damit verbundenen Selektionsdruck, der dadurch entsteht. Während Substanzen, die eine geringe antivirale Aktivität aufweisen keinen hohen Selektionsdruck aufbauen und somit sich die mutierten Quasispezies gegenüber dem Wildtyp nicht durchsetzen können, hemmen Substanzen mit hoher antiviraler Aktivität wiederum die

Replikation in dem Maße, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Mutationen ebenfalls stark verringert wird (Locarnini *et al.*, 2004). Wird durch die antivirale Aktivität der Anteil des Wildtyps gesenkt, entsteht für die Resistenzmutanten ein Selektionsvorteil, sodass sie die den Wildtyp verdrängen können und letztendlich zu einem Therapieversagen führen. Um sich dann in der Leber ausbreiten zu können, sind die Resistenzmutanten auf uninfizierte Hepatozyten angewiesen, die sie infizieren können. Die Möglichkeit der Bildung neuer uninfizierter Hepatozyten und der Abbau mit Wildtyp infizierter Zellen hängt wesentlich von dem Ausmaß der entzündlichen Aktivität und der Immunantwort ab, die das Virus im Wirt induziert. (Zhang and Summers, 2000). Die Entwicklung einer Resistenzmutation hängt auch von der genetischen Barriere der antiviralen Substanz ab. Diese zeigt an, wieviele Mutationen notwendig sind um dem Wirkmechanismus der antiviralen Medikamente zu entkommen. Wenn für die Ausbildung einer Therapieresistenz nur eine Punktmutation notwendig ist, besteht eine niedrigere genetische Barriere. Im Gegensatz dazu ergibt sich eine höhere genetische Barriere, wenn für die Selektion einer Therapieresistenz zwei oder mehrere Punktmutationen notwendig sind, da sie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit in einer Spezies auftreten. Eine Mutation, die zu einer Therapieresistenz führt, kann entweder direkt in Zusammenhang mit der Therapieresistenz stehen und wird dann primäre Mutation genannt. Ferner können sekundäre Mutationen, oder auch kompensatorische Mutationen die virale Fitness der Virusmutante erhöhen.

1.5.2 Therapieresistenzen unter Nucleosid-/ Nukleotidtherapie

Die verfügbaren NUC unterscheiden sich hinsichtlich ihrer antiviralen Potenz und der Ausbildung von Therapieresistenzen. Das Medikament mit den höchsten Ausbildungsraten einer Resistenz ist LAM. Die jährliche Rate einer Resistenzentwicklung unter LAM beträgt 14-24%/Jahr und im fünften Jahr nach Therapiebeginn zeigen ca. 70% aller Patienten eine Resistenz (Lok *et al.*, 2003) (Abbildung 1.6). Die am häufigsten auftretenden Resistenzmutationen für LAM sind rtM204V und rtM204I. Die Mutation führt im YMDD-Motiv der C-Domäne des

Polymerasegens zu einer Verminderung der Bindungsaffinität von LAM an die Polymerase und einer verminderten katalytischen Aktivität bei der Integration von LAM während der Replikation der viralen DNA ((Allen *et al.*, 1998) (Lee and Chu, 2001) (Das *et al.*, 2001)). Häufig wird die Mutation rtM204V/I in Kombination mit der Mutation rtL180M gefunden, welche eine kompensatorische Mutation darstellt und die virale Fitness erhöht. ADV zeigt im Vergleich zu LAM moderate Resistenzraten. Sie liegen bei ca. 2% nach 2 Jahren und 29% nach 5 Jahren ((Yang *et al.*, 2002) (Hadziyannis *et al.*, 2006)) (Abbildung 1.6). Die am häufigsten auftretenden Resistenzmutationen gegenüber ADV sind rtA181T/V und rtN236T in der B- bzw. D-Domäne des Polymerasegens ((Villet *et al.*, 2008) (Angus *et al.*, 2003) (Villeneuve *et al.*, 2003)) (Abbildung 1.7). Diese Mutationen liegen außerhalb des katalytischen Zentrums. In molekularen Modellierungen der viralen Polymerase konnte für die Mutation rtN236T gezeigt werden, dass sie möglicherweise die Bindungsaffinität von ADV verringert (Yadav and Chu, 2004). TNV gehört von seiner chemischen Struktur wie ADV zu den Alkyl-Phosphonaten und hat daher einen ähnlichen molekularen Wirkmechanismus. Es zeigt neben ETV die niedrigsten Resistenzraten. Tatsächlich konnte nach 4 Jahren Monotherapie mit TNV keine Resistenzentwicklung nachgewiesen werden (Snow-Lampart *et al.*, 2011) (Abbildung 1.6). Andere Klinische Studien haben gezeigt, dass in Patientenkollektiven, in denen vermehrt die Mutationen rtN236T und rtA181T/V vorkamen und die ein Therapieversagen unter ADV-Therapie entwickelt haben, eine verminderte Effektivität von TNV eintrat ((Van Bömmel *et al.*, 2010) (Patterson *et al.*, 2011)). Dies konnte in späteren Studien jedoch nicht bestätigt werden (Berg T J Hepatol 2014). *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass die Doppelmutation rtN236T/rtA181T/V mit einer sieben bis zehnmal verminderten Sensitivität von TNV einhergehen ((Qi *et al.*, 2007)(Gilead, 2010) (Villet *et al.*, 2008)). Für die Einzelmutation rtN236T konnte *in vitro* auch gezeigt werden, dass sie mit einem verminderten Ansprechen auf TNV einhergeht (Murakami E, 2015).

ETV gehört zu den D-Zyklopentanen und hat bezüglich einer Resistenzentwicklung die höchste genetische Barriere. Das heisst, dass

mindestens drei Mutationen, die bekannte LAM-Resistenz mit der Doppelmutation rtM204V/rtL180M und zusätzlich entweder rtS202I/G oder rtM250V oder rtT184G/S notwendig sind, um eine Therapieresistenz zu verursachen (Abbildung 1.7).

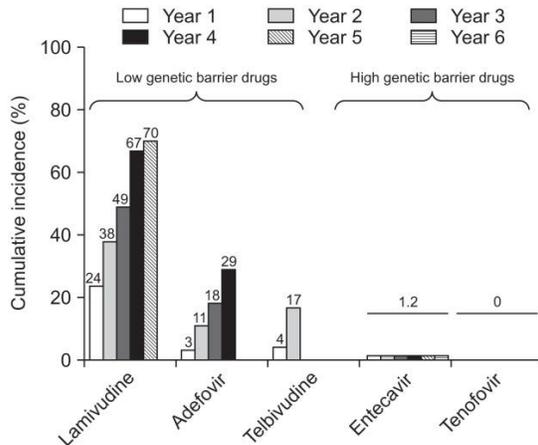


Abbildung 1.6. Darstellung der Inzidenzraten einer Resistenzentwicklung unter NUC-Therapie. Die Balken zeigen für die jeweiligen Medikamente die Rate einer Resistenzentwicklung unter Therapie für einen Zeitraum von 1 bis 6 Jahren an. Lamivudin, Adefovir und Telbivudin sind NUC mit einer niedrigen genetischen Barriere. Sie weisen hohe Inzidenzraten für eine Resistenzentwicklung auf. Im Gegensatz dazu zeigen Tenofovir und Entecavir niedrige Inzidenzraten aufgrund ihrer hohen antiviralen Potenz und hohen genetischen Barriere auf. Entnommen aus Lim et al Gut Liver 2017

In der klinischen Anwendung liegt die Rate einer Resistenzentwicklung nach fünf Jahren bei Patienten, die im Vorfeld keine andere NUC-Therapie erhalten haben, unter ETV bei 1,2 % (Abbildung 1.6). Bei Patienten, die im Vorfeld mit LAM therapiert wurden, liegt die Ausbildung einer Resistenz dramatisch höher. Hier zeigten sich Resistenzraten von 51% nach fünf Jahren (Tenney *et al.*, 2009).

Ein wesentliches Problem beim Management von Patienten mit Resistenzmutationen stellen Kreuzresistenzen dar. Diese sind definiert als das Vorhandensein einer Mutation, die ein Nichtansprechen bei mindestens zwei verschiedenen antiviralen Substanzen unabhängig voneinander verursacht (Ghany M; 2007). Eine Umstellung auf ein Präparat mit einer Kreuzresistenz hätte demnach zur Folge, dass es ebenfalls nicht ansprechen würde. Kreuzresistenzen treten häufig innerhalb derselben Substanzklassen auf. So bewirkt die LAM-Resistenzmutation rtM204V ebenfalls bei dem anderen L-

Nucleosid TLV eine Therapieresistenz (Nash, 2009). Jedoch sind auch zwischen den Substanzklassen Kreuzresistenzen möglich, wie zum Beispiel rtA181V/T, welche nicht nur gegen LAM und TLV, sondern auch gegen ADV ein Therapieversagen bewirkt ((Warner and Locarnini, 2008)(Villet *et al.*, 2008)). Für ETV ist, wie oben schon erwähnt, die ebenfalls unter LAM auftretende Doppelmutation rtM204V/rtL180M in Kombination mit einer der oben genannten dritten Mutation notwendig, um ein Therapieversagen zu verursachen. Mögliche Kreuzresistenzen sollten bei der Entscheidung, auf welches Präparat bei Therapieresistenzen umgestellt werden sollte, berücksichtigt werden. So sollte zum Beispiel bei einer Therapieresistenz unter LAM eine Umstellung auf TNV und nicht ETV erfolgen (Tacke and Kroy, 2016).

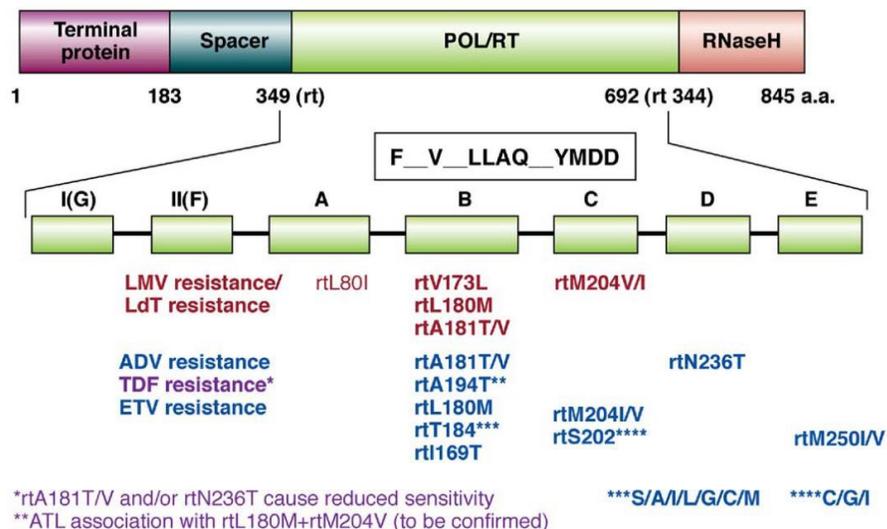


Abbildung 1.7 Darstellung der bisher beschriebenen Resistenzmutationen gegenüber NUC. Die Mutationen treten im Gen der HBV-Reversen-Transkriptase auf. Die häufigste Mutation gegenüber Lamivudin (LMV) ist im YMDD-Motiv rtM204V/I. Sie führt auch bei Telbivudin (LdT) und bei Entecavir in Kombination mit rtL180M und entweder rtS202I/G oder rtM250V oder rtT184G/S zu einem Therapieversagen. Bei Adefovir (ADV) ist als Resistenzmutation rtN236T und rtA181T/V. rtA181T/V ist ebenfalls als Resistenzmutation für LMV und LdT beschrieben und spielt bei der Kreuzresistenz eine wichtige Rolle. Abbildung entnommen von Zoulim and Locarnini 2009 (Zoulim and Locarnini, 2009).

1.5.3 Weitere Mutationen

Neben den Resistenzmutationen im HBV-Polymerase ORF gibt es noch Mutationen in anderen ORF des viralen Genoms, welche die Funktionalität des

Virus wesentlich beeinflussen können. Das HBsAg bildet die Virushülle und ist eines der Hauptepitope bei der humoralen Immunantwort. Bei der Antikörperbindung ist dabei im wesentlichen die „a“ Determinante der *major hydrophilic region* (MHR) des HBsAg beteiligt (Kay and Zoulim, 2007). Mutationen in den für diese Region kodierenden Abschnitten im PreS/S-Leserahmen führen zu einer Veränderung der Antigenität von HBV. Daraus resultiert zum einen, dass falsch negative Befunde bezüglich des HBsAg-Status entstehen können, wodurch die Infektionen „okkult“ verlaufen können und zum anderen die durch eine Hepatitisimpfung entstandenen Antikörper nicht mehr das Virus neutralisieren können, was als *Immune Escape* bezeichnet wird. Die häufigsten *Immune Escape*-Mutationen sind sG145R und sP120T (Amini-Bavil-Olyae et al., 2010). „Okkulte“ Hepatitis B Infektionen stellen vor allem im Bereich der Transfusionsmedizin für die Sicherheit von Blutprodukten eine Herausforderung dar. Hier ist ebenfalls die Mutation sG145R/A identifiziert worden (Huang et al., 2012).

Durch die Überlappung des Leserahmens der Polymerase mit den Leserahmen PreS/S, Precore/Core und X, haben Mutationen, die unter der antiviralen Therapie selektiert werden einen möglichen Einfluss auf die Funktion der anderen viralen Proteine. So codiert die Resistenzmutation gegen L-Nucleoside und ADV rtA181T in der S-Region ein Stopp-Codon (sW172*), was zu einer Verkürzung des S-Proteins führt. Dies führt wiederum zu einem Defekt der Sekretion von Virionen (Warner and Locarnini, 2008). S-Genmutationen, die unter antiviraler Therapie entstehen werden unter dem Akronym ADASM (*antiviral drug associated S gene mutation*) zusammengefasst.

Mutationen im Precore/Core-Leserahmen können zu Veränderungen des HBeAg und seiner Sekretion führen. Infektionen mit diesen Mutanten verlaufen als HBeAg negative Hepatitis B. Die dafür verantwortlichen Mutationen entstehen v.a. im *basal core promotor* (BCP) und in der PreCore Region. Eine typische Doppelmutation, welche im BCP auftritt, ist A1762T/G1764A. Sie führt zu einer verminderten PreCore-mRNA-Synthese (Buckwold et al., 1997). Die häufigste *PreCore*-Mutation ist G1896A, welche durch ein Stopp-Codon zu einer Inhibition

der HBeAg-Synthese führt (Carman *et al.*, 1989). Weiterhin werden BCP und *PreCore*-Mutationen in Zusammenhang gebracht mit fulminanten Infektionsverläufen und der Entstehung vom HCC ((Liao *et al.*, 2012)(Inoue *et al.*, 2009)). Das X-Protein wird ebenfalls in Zusammenhang mit der Entstehung von HBV-induziertem HCC gebracht (Sirma *et al.*, 1999)(Iavarone *et al.*, 2003). Hier wurden vor allem Deletionen am 3'-Ende des X-Gens beschrieben. Die daraus entstehenden trunkeierten X-Proteine induzieren oxidativen Stress und eine Schädigung der mitochondrialen DNA und fördern dadurch die Entstehung des HCC (Jung and Kim, 2013).

1.5.4 Detektion von Resistenzmutationen

Der Verdacht einer Therapieresistenz entsteht, wenn es bei einem Patienten unter bestehender antiviraler Therapie zu einer unzureichenden Senkung oder zu einem Wiederanstieg der viralen Last kommt. Zur Diagnostik einer Therapieresistenz stehen grundsätzlich genotypische und phänotypische Analyseverfahren zur Auswahl. Bei der genotypischen Analyse werden idealerweise Proben der viralen DNA des Patienten vor Therapie und nach Auftreten des Therapieversagens verglichen. Hierfür werden die Nukleotidsequenzen der viralen Polymerase sequenziert und nach neu aufgetretenen Mutationen gesucht. Die Sequenzierung erfolgt üblicherweise über eine PCR-basierte Sequenzierung. Hier können neu aufgetretene Mutationen detektiert werden, wenn sie einen Anteil von >20% an dem Quasispeziespool ausmachen (Shaw, Bartholomeusz and Locarnini, 2006). Ein neueres Verfahren, bei dem kleinere Mutantenpopulationen detektiert werden können, stellt die Pyrosequenzierung dar (Margeridon-Thermet *et al.*, 2009). Ein weiteres Verfahren stellt die Genotypisierung über Hybridisierung dar. Diese erfolgt entweder über DNA-Chip-*Microarrays*, über massenspektroskopische Analyse oder *line probe assays* (Zoulim and Locarnini, 2009).

Bei der phänotypischen Untersuchung kann der direkte Zusammenhang einer Mutation mit einem Nichtansprechen auf ein NUC untersucht werden. Hierzu werden in Zellkulturen vormals durch Klonierung generierte HBV-Replikons mit

einer Mutation transfiziert und mit dem NUC behandelt. Die Abnahme der Viruskopienzahl kann dann mittels qPCR ermittelt und mit dem Ansprechen einer mit dem Wildtypplasmid transfizierten Zellreihe verglichen werden. Neben der Effizienz des NUC, welches mit einem Therapieversagen bei der Mutation in Zusammenhang gebracht wurde, können auch andere NUC dabei auf eine Suszeptibilität für die Mutationen untersucht werden. Außerdem können in den phänotypischen Untersuchungen auch Analysen bezüglich der Replikationskompetenz einer Resistenzmutante erfolgen.

1.6.Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Die Entwicklung von antiviralen Resistenzen bei der Therapie der CHB mit NUC stellt eine große Herausforderung für den Kliniker dar und führt bei den Patienten zu einer klinischen Verschlechterung mit Progression der entzündlichen Veränderungen der Leber, bis hin zur Entwicklung eines HCC. So steigt unter einer Therapie mit dem Nukleosidanalogen LAM die Rate der Therapieversager auf ca. 70% nach einer Therapiedauer von 5 Jahren. Bei der Therapie mit dem Nukleotidanalogen ADV werden Raten von 29% nach fünf Jahren beschrieben. Als ursächlich für die Therapieresistenzen wurden Mutationen in der RT-Region des HBV Genoms identifiziert. Die häufigsten Mutationen, die eine Resistenz gegenüber LAM verursachen sind rtM204V und rtM204I, und gegenüber ADV die Mutationen rtN236T und rtA181V/T.

Um besser auf ein Versagen der Therapie eingehen zu können und schnell die Ursache zu identifizieren, ist es idealerweise sinnvoll, die Mutationen frühzeitig durch genotypische und phänotypische Resistenzanalysen zu identifizieren und die Therapie entsprechend umzustellen.

In Vorarbeiten zu der vorliegenden Doktorarbeit (Walker C, 2009) wurden durch statistische Auswertung der Sequenzanalysen der viralen Polymerase aus Proben von 276 CHB Patienten, die ein Therapieversagen unter ADV-Therapie entwickelten, Mutationen beschrieben, die signifikant im klinischen Zusammenhang mit einem verminderten Therapieansprechen stehen können. Dabei wurden besonders für die Mutationen in der RT-Region des HBV-Genoms

rtN248H sowie die Doppelmutationen rtN248H/E263D eine Assoziation mit einem signifikanten Wiederanstieg der Transaminasen unter ADV-Therapie beobachtet. Zudem wurde für die Mutationen rtT128I/N ($p=0,035$) sowie für rtA38E/T ($p=0,008$) und rtL231V ($p=0,015$) eine signifikante Korrelation mit einem Wiederanstieg der viralen Last gesehen (Walker, 2009).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde in Zellkultur basierten phänotypischen Analysen mit HBV-Replikons untersucht, ob die Mutationen rtT128I und rtT128N auf eine Behandlung mit ADV mit einem verminderten Ansprechen reagieren, verglichen mit dem Ansprechen des Wildtyps auf ADV. Weiterhin sollte untersucht werden, ob bei der Doppelmutation rtN248H/E263D der als kompensatorische Mutation vermutete Austausch E263D einen zusätzlichen Effekt auf das bereits bei der Einzelmutation rtN248H gezeigte verminderte Ansprechen auf ADV hat. In einem zweiten Teil sollte mittels phänotypischer Analysen mit HBV-Replikons untersucht werden, ob TNV als Alternativpräparat effektiv mit hoher Suszeptibilität gegenüber den potenziellen antiviralen Resistenzmutationen rtT128I und rtT128N wirkt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Lösungen, Puffer

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

2.1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS (phosphate buffered saline):

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
<i>NaCl</i>	1,4 M
<i>KCl</i>	27 mM
<i>Na₂HPO₄</i>	150 mM
<i>KH₂ PO₄</i>	18 mM

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit HCl eingestellt.

TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer):

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
<i>Tris</i>	40 mM
<i>EDTA</i>	2 mM
<i>NaCl</i>	5 mM

Der pH-Wert von 7,8 wurde mit Essigsäure eingestellt

SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate): wässrig; Dodecylsulfat-Natriumsalz, 10 % oder 20 %

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

Ethidiumbromid: 10 µg/ml in 1x TE

2.1.2 Lösungen für die Zellkultur

Lösung für die Zellkultivierung

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

2.1.3 Puffer und Lösungen für Bakterienkultivierung

LB-Medium (Luria Bertani)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
<i>Trypton</i>	10 g
<i>Hefeextrakt</i>	5 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Glukose</i>	1 g
<i>H₂O</i>	ad 1l

pH 7,5 mit NaOH einstellen; autoklavieren.

LB-Agar Platten

-LB-Medium + 1,5 % Agar

-nach dem Autoklavieren auf ca. 60°C abkühlen lassen, Antibiotikum dazugeben,

-Platten gießen und bei 4°C lagern

-Verwendetes Antibiotikum:

Ampicillin, Endkonzentration: 100 µg/ml

SOC Medium (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
<i>Trypton</i>	20 g
<i>Hefeextrakt</i>	5 g
<i>NaCl</i>	10 mM
<i>KCl</i>	2,5 mM
<i>MgCl₂</i>	10 mM
<i>MgSO₄</i>	10 mM
<i>Glukose</i>	20 mM
<i>H₂O</i>	ad 1l

Nach Autoklavierung bei 4 °C gelagert

2.1.4 Lösung für die Zellernte

Lysepuffer

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
<i>Tris-Base</i>	2,4 g
<i>NaCl</i>	8,8 g
<i>EDTA 0,5 M</i>	2 ml
<i>NP-40</i>	10 ml
<i>Glycerinl</i>	100 ml
<i>H₂O</i>	Ad 500 ml

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit HCl eingestellt. Nach Autoklavierung wurde bei 4°C gelagert.

2.2 Kommerzielle Kits

KIT	HERSTELLER
<i>ABI-PRISM BIGDYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING</i>	Applied Biosystems
<i>READY REACTION KIT V2.0</i>	Applied Biosystems
<i>NUCLEOBOND PC 500 (MAXIPRÄP)</i>	Macherey Nagel
<i>NUCLEOSPIN EXTRACT II</i>	Macherey Nagel
<i>NUCLEOSPIN PLASMID</i>	Macherey Nagel
<i>PGEMTEASY</i>	Promega
<i>HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT</i>	Roche
<i>QUIK CHANGE II SITE-DIRECTED-MUTAGENESIS KIT</i>	Stratagene

Die Verwendung der Kits erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.3 Enzyme

ENZYM	HERSTELLER
<i>T4 DNA LIGASE</i>	New England Biolabs
<i>RESTRIKTIONS-ENDONUKLEASEN (ECO R I, NCO I, DPN I)</i>	New England Biolabs
<i>TAQ DNA-POLYMERASE</i>	New England Biolabs
<i>DNASE-I</i>	Roche
<i>LIGHTCYCLER® URACIL-DNA GLYCOSYLASE</i>	Roche
<i>PROTEINASE K</i>	Qiagen

Die Verwendung der Enzyme erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.4 Verbrauchsmaterialien

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

2.5 Geräte und Zubehör

GERÄT / ZUBEHÖR	HERSTELLER
BRUTSCHRANK	Heraeus
ELEKTROTRANSFORMATOR GENE PULSER	Bio-Rad
ELEKTROPHORESEKAMMER FÜR AGAROSEGELE OWL	Peqlab
FEINWAAGE MC1	Sartorius
QUARZKÜVETTEN	Bio-Rad
KAPILLARSEQUENZIERER ABI-PRISM 310 GENETIC ANALYZER	Applied Biosystems
LIGHTCYCLER 480 INSTRUMENT	Roche
MAGNETRÜHRER	Heidolph
MIKROSKOP: IMT-2 PHASENKONTRAST KLWCD 0.30	Olympus
NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	Brand
PHOTOMETER: SMARTSPEC 3000	Bio-Rad
PH-METER PH 525	WTW
PIPETTEN	Gilson
PIPETTEN EPPENDORF® RESEARCH® PLUS PIPETTE	Eppendorf
PIPETTENSPIZEN EPPENDORF® EPT.I.P.S. BIOPUR®, RACKS	Eppendorf
STERILWERKBÄNKE LAMINAIR HB2448	Heraeus
THERMOMIXER	Eppendorf
TGRADIENT THERMOCYCLER	Biometra
TPERSONAL 48 THERMOCYCLER	Biometra
PCR-GERÄTE:PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab
PIPETTIERHILFE ACCU-JET, ACCU-JETPRO	Neolab
WAAGE SARTORIUS BASIC	Sartorius
VORTEX VF2	Janke & Kunckel
ZELLBRUTSCHRANK TYP 6000	Heraeus
ZENTRIFUGE HERMLE ZK 380	Eppendorf

ZENTRIFUGE SORVALL RT 6000D, ROTOR: H1000B	Sorvall
ZENTRIFUGE SORVALL MC 12V, ROTOR F-12/M.18	Sorvall
ZENTRIFUGENFLASCHEN FÜR ROTATOR GSA: DRY-SPIN BOTTLE	Sorvall

2.6 Primersequenzen für PCR

Primername	Sequenz
<i>rtT128I sense</i>	5'-C AAC CAG GGG A ^a C ATG CCG GAC CTG C-3'
<i>rtT128I antisense</i>	5'-G CAG GTC CGG CAT G ^t T CCC GTG CTG GTT G-3'
<i>rtT128N sense</i>	5'-C AAC CAG GGG A ^t C ATG CCG GAC CTG C-3'
<i>rtT128N antisense</i>	5'-G CAG GTC CGG CAT G ^a T CCC GTG CTG GTT G-3'

Tabelle 2.1 Primer für die Mutagenese

Primername	Sequenz
<i>HBV-FW- 443S</i>	5'-TTC TTC TGG ACT ATC AAG G-3'
<i>HBV-RW-769AS</i>	5'-ACT CAA GAT GCT GTA CAG-3'

Tabelle 2.2: Primer für die Sequenzierung

Name	Sequenz
<i>HBV-580F</i>	5'-GCCTCGCAGACGCAGATC-3'
<i>HBV-643R</i>	5'-ACATTGAGATTCCCGAGATTGAG-3'
<i>HBV-Taqprobe</i>	5'-(FAM)-CCATCGCCGCGTCGCAGAAG-(TAMRA)-3'

Tabelle 2.3: Primer und Probe für die quantitative PCR

2.7 Methoden

2.7.1 Identifizierung potenzieller Adefovir-Resistenzmutationen

Um *in vitro* zu untersuchen, wie die HBV-Polymerase-Mutationen rtT128I, rtT128N und die Doppelmutation rtN248H/rtE263D die Suszeptibilität auf Adefovir Diprivoxil ADV beeinflussen, wurden in Zellkulturversuchen HepG2-Zellen mit replikationskompetenten HBV-Plasmiden, die entweder eine Mutation, oder den Wildtyp beinhalten, transfiziert und über sechs Tage in aufsteigenden Konzentrationen mit 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM und 50 µM ADV behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und die virale DNA isoliert. Die Viruslast der einzelnen Proben wurde mit quantitativer *real time* PCR (qPCR) bestimmt und daraus Dosiswirkungskurven berechnet. Aus den Dosiswirkungskurven wurde

dann die IC_{50} , das heißt die Konzentration bei der die Viruslast zu 50% reduziert wurde, kalkuliert. Dieser wurde dann mit der IC_{50} des Wildtyps in Relation gesetzt und statistisch auf einen signifikanten Unterschied getestet.

2.7.2 Generierung der Replikons mit der Mutation rtT128I und rtT128N mittels *site directed mutagenesis*

Um die Mutationen rtT128I und rtT128N in ein replikationskompetentes Plasmid einzusetzen, wurde eine *site directed mutagenesis* mit dem *QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) durchgeführt. Hierfür wurde aus dem Wildtypplasmid pHBV 1,28 mit dem Genotyp D (Bock *et al.*, 1999) das Genom der viralen Polymerase über einen Restriktionsverdau an den Schnittstellen EcoR I und Nco I ausgeschnitten (Kap. 2.6.5) und in den Trägervektor pGEM T easy über Ligation eingefügt (Kap. 2.6.8). Der das Wildtyp-Polymerase tragende pGEM-T-easy-Vektor wurde dann mit einer Pfu-Polymerase und den in Tabelle 2.1 aufgeführten, die Punktmutation tragenden Primern in einer PCR vervielfältigt, wodurch pGEM-T-Easy-Vektoren mit der Mutation rtT128I oder rtT128N entstanden (Kap. 2.6.9).

Durch einen Enzymverdau mit Dpn I, der spezifisch methylierte DNA verdaut, wurde die paternale DNA entfernt, sodass nur noch die Vektoren mit der Punktmutation übrigblieben (Kap. 2.6.10). Die neu generierten pGEM-T-Easy-Vektoren mit den Punktmutationen wurden zur Vervielfältigung entweder elektroporatisch, oder chemisch in *Escherichia Coli* Bakterien (*E. Coli*) transformiert (Kap. 2.6.11), auf Ampicillin beimpfte LB-Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37° C inkubiert (Kap. 2.6.2). Die auf der Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden schließlich einzeln in LB-Medium eine weitere Nacht kultiviert und die Plasmide mit einer Mini-Präparation aufgereinigt (Kap. 2.6.4).

Um zu überprüfen, ob die Punktmutationen in den Plasmiden enthalten sind, wurden die Abschnitte mit den Mutationen mit in Tabelle 2 aufgeführten Primern sequenziert (Kap. 2.6.12). Aus den pGEM-T-Easy-Vektorplasmiden, die die

Mutation nach Sequenzierung enthielten, wurde mit einem weiteren Restriktionsverdau an den Schnittstellen EcoR I und Nco I das Polymerasegen ausgeschnitten und in einem Kasettenaustausch mit dem Wildtypplasmid, aus dem ebenfalls durch Restriktionsverdau das Polymerasegen herausgeschnitten wurde, religiert. Die EcoR I / Nco I-Plasmidfragmente wurden dazu mittels Agarose-Gel Elektrophorese getrennt (Kap. 2.6.6). Das Polymerasefragment, welches eine Länge von 1882 Nukleotiden besitzt und der Wildtypvektor wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *Nucleospin Extract Kit* (Macherey Nagel) aufgereinigt. Die zwei Fragmente wurden dann mit dem Enzym Ligase zusammengefügt.

Die neu entstandenen Plasmide pHBVrtT128I und pHBVrtT128N wurden in E.Coli Bakterien transformiert und diese dann auf mit Ampicillin beimpften LB-Agaroseplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden für eine Maxi-Präparation in LB-Medium gelöst und über eine weitere Nacht (8-16 Stunden) im Brutschrank bei 37°C kultiviert (Kap. 2.6.3). Die aus der Präparation gewonnenen Plasmide wurden anschließend im Polymeraseabschnitt sequenziert um zu überprüfen, ob die gewünschten Mutationen auch in diesen Plasmiden enthalten sind.

2.7.3 Plasmid DNA Präparation

Die Präparation diente dazu Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen zu gewinnen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Plasmid-tragenden Bakterien in einem LB-Medium über Nacht kultiviert (Kap. 2.7.4). Nach Abzentrifugieren (6000g) wurde das LB-Medium verworfen und aus dem Pellet der Bakterien durch entweder eine Maxi- oder eine Minipräparation (Kap. 2.6.3, 2.6.4) aufgereinigt.

2.7.4 Kultivierung der Bakterien

Die Bakterien wurden entweder nach Transformation auf eine Ampicillin beimpfte LB-Agarplatte aufgestrichen oder in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml Ampicillin beimpften LB-Medium pipettiert und danach im Brutschrank bei 37°C über Nacht für ca. 16 Stunden inkubiert. Die in LB-Medium gelösten Bakterien wurden mit 200 rpm geschüttelt.

2.7.5 Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid DNA wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Die Präparation erfolgte mit dem *NucleoBond PC 500 Kit* (Macherey Nagel). Nachdem die Plasmid-haltigen Bakterien in 100ml LB-Medium gelöst über Nacht inkubiert wurden, wurde das Medium bei 4°C bei 4500-6000 g für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend alkalisch lysiert. Dafür wurden sie zuerst mit dem RNase haltigen Puffer S1 resuspendiert, mit Puffer S2 für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit Puffer S3 bei 4°C Temperatur auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Das Lysat wurde gefiltert und die Plasmide in einer zuvor mit Puffer N2 äquilibrierten AX500 Säule gebunden und mit Puffer N3 gewaschen. Danach wurden die Plasmide aus der Säule mit dem N5 Puffer eluiert und mit 35% Isopropanol präzipitiert. Zum Trennen der Plasmide aus der Lösung wurde diese bei 15000 g für 30 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden anschließend, nachdem der Überstand verworfen worden war mit 70% Ethanol gewaschen und erneute 10 Minuten bei 15000 g und 4° C zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet nach Trocknung bei RT in TE-Lösung aufgenommen.

2.7.6 Mini Präparation

Um kleinere Plasmid-DNA-Mengen zu erhalten, wurde eine Mini-Präparation mit dem *NucleoSpin Kit* (Macherey Nagel) durchgeführt. Für die Mini-Präparation wurden in 5 ml LB gelöste E. coli über Nacht kultiviert und am nächsten Tag für 30 Sekunden bei 11000 g aufgeteilt in 1,5 ml „Eppendorf“-Röhrchen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde lysiert, nachdem der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer A1 aufgenommen und gevortext. Nach Zugabe von 250 µl Puffer A2 wurde nach vorsichtigem Schwenken das Lysat für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und 300 µl Puffer A3 dazugegeben. Das Lysat wurde für 5 Minuten mit 11000 g bei RT zentrifugiert um die Plasmid-DNA von den Zellresten zu trennen. Der Überstand wurde vorsichtig in *NucleoSpin*-Säulen (Macherey Nagel) überführt und durch Zentrifugation für 1 Minute bei

11000 g die Plasmid-DNA darin gebunden. Nach wiederholten Waschvorgängen, bei denen jeweils 500 µl Puffer AW und 600 µl Puffer A4 durch die Säulen durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 g durch die Säulen liefen, wurde die Säule durch erneutes Zentrifugieren für 2 Minuten getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde schließlich mit 50µl Puffer AE durch Zentrifugation für 1 Minute eluiert. Durch erneute Zentrifugation wurde das erhaltene Plasmid-Pellet vom Überstand getrennt und nach Reinigung mit 70% Ethanol und Trocknung im *Thermomixer* in TE-Lösung aufgenommen. Die Konzentration der Plasmide wurde im Anschluss mit einem Nano Drop Photometer bestimmt und die Lösung auf eine gewünschte Endkonzentration verdünnt.

2.7.7 Restriktionsverdau

Um das Polymerasegen von dem Wildtyp-Plasmid, beziehungsweise nach Mutagenese von dem pGEM-T-easy-Trägervektor zu trennen, erfolgte ein Restriktionsverdau an den Schnittstellen Eco R I und Nco I. Die Schnittstellen befinden sich für EcoR I an der Nukleotidposition 3180 und für Nco I an der Nukleotidposition 1374 des HBV-Genoms. Für den Verdau wurden die Wildtypplasmide pHBV 1,28 (Genotyp D) oder der Trägervektor mit dem mutierten Polymerasegen pGEM-rtT128N oder pGEM-rtT128I verwendet. 0,4-5µg Plasmid wurden bei 37° C für zwei Stunden mit 10xTango-Puffer und den Enzymen EcoR I und Nco I (1-5 IU/µg) inkubiert und dann die Enzymreaktion bei 65°C inaktiviert.

2.7.8 Gelelektrophorese

Um die durch Restriktionsverdau geschnittenen DNA-Fragmente aufzutrennen, wurden sie auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurden 50 ml TAE-Puffer mit 0,5 g Agarose erhitzt und anschließend 5 µl Ethidiumbromid dazugegeben. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und nach Polymerisierung des Gels die Kammer mit TAE-Puffer befüllt. 25µl der DNA-Fragmente wurden dann mit 5 µl Probenpuffer (6x loading dye; Fermentas) in die

Taschen gefüllt und bei 90 V für 45-60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker lief parallel zu den Plasmidbanden ein Lambda pUC Mix Marker 4 (Fermentas). Nach der Elektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.7.9 Isolation der DNA Fragmente aus dem Gel

Das Fragment mit einer Länge von ca. 1882 Nucleotiden wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Um das Plasmid-Fragment aus dem Gel herauszulösen wurde das Gelstück mit dem *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey Nagel) behandelt. Dafür wurde in einer Silikatsäule mit entsprechenden Puffern nach Herstellerangaben das Gel aufgelöst, die DNA-Fragmente in der Säule gebunden, gewaschen und dann eluiert.

2.7.10 Ligation

Das ausgeschnittene und aufgereinigte Polymerasefragment wurde zur Mutagenese mit dem zuvor durch Restriktionsverdau an den Restriktionsstellen EcoR I und Nco I gespaltenen pGEM-T-Trägervektor ligiert, um es mit den die Punktmutation enthaltenen Primern amplifizieren zu können. Dafür wurden sie in einem molaren Verhältnis von 3:1 zwischen Polymerasefragment und Trägervektor mit 1 µl T4 DNA Ligase und 5µl Ligasepuffer (Promega) in ein 500µl Röhrchen gemischt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach erfolgreicher Mutagenese wurden die die Mutationen enthaltenden Trägervektoren pGEM T128I und pGEM T128N mit dem Zielvektor pHBV adw 1,28, der vorher durch EcoR I-/Nco I-Restriktionsverdau verdaut wurde, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, religiert.

2.7.11 PCR zur *site directed mutagenesis*

Die *site directed mutagenesis* wurde durch eine PCR des Polymerasegens an dem pGEM-T-Easy-Trägerplasmid mit einer Pfu-Polymerase (Stratagene) und den Primern, die den Nukleotidaustausch enthielten, durchgeführt (Tab. 1). Für die Reaktion wurde 50 ng des Trägerplasmids mit jeweils 125 ng Sense- und Antisense- Primern und 5 µl Reaktionspuffer in einem Ansatz von 50 µl

zusammengemischt. Dazu wurde 1 µl PfuTurbo DNA Polymerase hinzugefügt. Das *Thermocycler*-Protokoll ist in Tabelle 2.4 aufgeführt. Es wurden 12 Zyklen durchgeführt. Danach wurde das PCR-Produkt für zwei Minuten auf Eis inkubiert, um es auf eine Temperatur unter 37° C zu kühlen.

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95° C	30 Sekunden
12	95° C	30 Sekunden
	55° C	1 Minute
	68° C	5 Minuten

Tabelle 2.4 Protokoll für die Mutagenese-PCR

2.7.12 Dpn I Verdau

Um nach der Mutagenese die neu generierten Replikons pGEM T128I und pGEM T128N von der paternalen DNA zu trennen, wurde ein Verdau mit Dpn I (New England Biolabs) durchgeführt. Dieses Enzym baut spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA ab, wie sie überwiegend bei der DNA-Replikation in Bakterien verwendet wird. Infolgedessen bleiben nur noch die in der PCR replizierten Plasmide mit der Punktmutation übrig. Für den Verdau wurde 1µl Dpn I gemischt, vorsichtig vermischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.7.13 Transformation

Die Plasmide wurden nach der Mutagenese der Trägervektoren und nach der Religierung in den Zielvektor in kompetente Bakterienstämme transformiert. Hierfür wurde eine chemische Transformation oder eine Elektrotransformation angewendet.

2.7.13.1 Chemische Transformation

Für die chemische Transformation wurden kompetente *XL-Blue*-Zellen (Stratagene) verwendet. Sie wurden bei -80°C gelagert und für den Versuch vorsichtig auf Eis aufgetaut. Danach wurden davon 50 µl in ein vorgekühltes 14 ml „Falcon“-Röhrchen übertragen und 3 µl der Trägervektoren hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 42° C für 45 Sekunden hitzegeschockt und unmittelbar danach für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran wurden 500 µl auf 42° C vorgewärmte *NZY⁺-broth*

dazugegeben und die Ansätze bei 37° C im Schüttelinkubator inkubiert. Die kultivierten Zellen wurden dann auf selektive LB-Amp-Agarplatten aufgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

2.7.13.2 Elektrotransformation (Elektroporation)

Für die Elektrotransformation wurden kompetente E. Coli vom HB 101-Stamm verwendet. Sie wurden aus einem Glycerinstock, der bei -80°C gelagert wurde entnommen und zur Kultivierung über Nacht bei 37° C in LB-Medium im Schüttelinkubator inkubiert. Aus der Kultur wurden dann 50 µl entnommen und in eine vorgekühlte Elektrovaporationsküvette mit 3 µl des mutierten Trägervektors gegeben. Die Elektrotransformation erfolgte dann bei 1,8 mV 3,3 bis 4,7 Millisekunden. Im Anschluss daran wurden die Ansätze in SOC-Medium (Kapitel 2.1.3) aufgenommen und eine Stunde bei 37° C im Schüttelinkubator inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze bei 2500 g für 30 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand bis auf 150 µl Restvolumen verworfen und resuspendiert. Die Bakterien wurden schließlich auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.7.13 Sequenzierung

Zur Überprüfung, ob die Mutation nach erfolgter Mutagenese oder Religation im Zielvektor enthalten ist, wurde eine Sequenzierung des Abschnitts der viralen Polymerase durchgeführt. Die Sequenzierung wurde mit dem Kapillarsequenzier 310 (ABI-Prism) durchgeführt. Zuvor wurden die Plasmide mit in Tabelle 2.2 aufgeführten Primern in einer PCR amplifiziert. Für die PCR wurden 200 ng Plasmid-DNA, jeweils 1 pmol Sense- und Antisense Primer und 2 µl *BigDye Terminator Ready Reaction Mix* von Applied Biosystems auf ein Endvolumen von 10 µl mit Zugabe von destilliertem Wasser angesetzt. Das Protokoll des *Thermocyclers* ist in Tabelle 2.5 aufgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch eine Ethanol-fällung gereinigt und getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl *HiDi-Formamid* (Applied Biosystems) wurde die Probe sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend auf der Software Bio Edit 7.0 (Tom Hall; Ibis Therapeutics) überprüft

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	96 °C	4 Minuten
25	95 °C	15 Sekunden
	50 °C	15 Sekunden
	60 °C	75 Sekunden

Tabelle 2.5 Protokoll für die Sequenzierungs-PCR

2.8 Zellkulturversuche

Für die Zellkulturversuche wurden HepG2-Zellen, eine humane Lebertumorzelllinie, verwendet (BB Knowles, 1983). Die Versuche wurden an einer sterilen Werkbank in einem S2-Labor durchgeführt. Die Zellen wurden aus einem in Stickstofftanks bei -70°C gelagertem Stock aufgetaut, aufbereitet und in Zellkulturflaschen (Thermo Scientific) mit 20 ml DMEM-Nährmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 0,5 µg/ml Penicillin/Streptomycin im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle drei Tage wurden die am Flaschenboden konfluent angewachsenen Zellen vereinzelt und aufgeteilt. Dafür wurden nach Entfernung des Nährmediums der Zellrasen mit 2,5 ml PBS gewaschen und mit 2ml Trypsin-EDTA nach 3-5 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml DMEM aufgenommen, vom Flaschenboden gelöst, aufgetrennt und im Verhältnis 1:6 aufgeteilt. Für die Versuchsansätze wurden die Zellen auf *Six-Well*-Platten ausgesät. Pro Ansatz wurden 3x 10⁵ Zellen verwendet. Um die Zellen auszuzählen wurden die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen unter einem Mikroskop untersucht. Alternativ wurde das automatische Zählgerät *Cell Countess* (Invitrogen) verwendet. Bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen mit DMEM-Nährmedium im Brutschrank kultiviert.

2.8.1 Transfektion der Zellen

Das Einschleusen der Wildtyp- und mutierten HBV-Replikons erfolgte über eine liposomale Transfektion mit dem Lipofectamin-Transfektionsreagent (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Pro Ansatz wurde 1µg Plasmid-DNA auf 5 µl Lipofectamin gegeben, beides in Opti-MEM-Nährmedium gelöst und zuvor für 20

Minuten inkubiert. Die nach der Inkubation gebildeten DNA-Lipidkomplexe wurden dann auf die Zellplatten gegeben. Das Nährmedium wurde zuvor mit Opit-MEM Nährmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden für 8 h im Brutschrank mit den Transfektionsansätzen inkubiert und dann das Medium auf DMEM-Nährmedium gewechselt.

2.8.2 Behandlung von transfizierten Hep G2-Zellen mit Adefovir Dipivoxil oder Tenofovir Disoproxil

Nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe von ADV oder TNV. Dafür wurde je Probe eine Konzentration von 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM oder 50 μM der Wirkstoffe in DMEM-Medium gelöst. Der Mediumwechsel erfolgte alle 48h. Die Zellen wurden insgesamt für sechs Tage behandelt. Die Wirkstoffe wurden von Gilead bezogen und nach Herstellerangaben in sterilfiltriertem Wasser unter Titrierung mit 1M NaOH gelöst.

2.8.3 Zellernte

Nach der Behandlung mit den Wirkstoffen wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde das Medium abpipettiert und asserviert und die Zellen mit jeweils 1ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 200 μl Lysepuffer (Kap. 2.1.4) für 10 Minuten inkubiert und von der Platte abgeschabt, in „Eppendorf“-Röhrchen übertragen und bei 14000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand von den pelletierten Zellresten, die verworfen wurden, getrennt.

2.8.4 DNase- und Proteinase-Verdau

In einem weiteren Schritt wurde die nicht virale DNA aus dem Überstand entfernt. Dazu wurde nach Herstellerangaben 2 μl DNase (Fermentas) mit 20 μl DNase-Puffer (Fermentas) in die Proben gegeben und bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde dann nach Zugabe von 10 μl EDTA und einer Hitzeinaktivierung bei 72° C für 10 Minuten gestoppt. Um die HBV-Kapside aufzubrechen und die intrakapsidäre DNA freizusetzen erfolgte ein Proteinase K-Verdau. Dazu wurden 8 μl Proteinase K und 10% SDS mit einer Zielkonzentration von 0,5% hinzugegeben (Kap. 2.1.1) und die Proben bei 56° C für zwei Stunden inkubiert.

2.8.5 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der viralen DNA erfolgte mit dem *High Pure Viral DNA Extraction-Kit* (Roche). Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll die virale DNA der Proben in Röhrchen in einem Glassfaservlies durch Zentrifugation (8000-13000g) gebunden, gewaschen und dann eluiert.

2.9 Quantitative *real time* PCR

Zur Bestimmung der Kopienzahl der viralen DNA erfolgte eine quantitative *real time* PCR (qPCR) unter Verwendung von *Platinum Taq DNA-Polymerase* (Invitrogen). Für den qPCR-Probenansatz von 25 µl wurden 5 µl der isolierten HBV-DNA mit 0,25 µl Taq-Polymerase, 0,75 µl des Vorwärts- und 0,75 µl des Rückwärtsprimer (Primer Tab. 2.3), 0,25 µl *FAM-TAMRA-Probe* (Probe Tab. 2.3), 2,5µl 10x Platinum Puffer, 2 µl MgCl₂, 2 µl dUTPs, 0,25 µl Uracil-DNA-Glycosylase und 11,3 µl RNase-freiem Wasser versetzt. Die PCR-Reaktion und Detektion der Fluoreszenz erfolgte im *Lightcycler 480 PCR System* (Roche) nach dem Protokoll in Tab. 2.7. Der Amplifikationsbereich dieser quantitativen PCR liegt im *Core-Gen* des HBV-Genoms. Die Kopienzahl wurde anhand einer Standardkurve, die aus der Messung der Schwellenwerte (*Threshold Cycle*-(Ct-)Werte) einer Verdünnungsreihe des Plasmids pHBV 1,28 erstellt worden war, bestimmt. Die Verdünnungsreihe, wie in Abbildung 2 dargestellt, enthielt Plasmid-DNA-Mengen von 10 pg bis 1 fg. Die HBV-Genomgröße beträgt 3200 bp, sodass 10 pg Plasmid etwa $2,8 \times 10^6$ Kopien entspricht. In Abbildung 1 werden exemplarisch die Fluoreszenzkurven der Proben aus einem Versuch dargestellt.

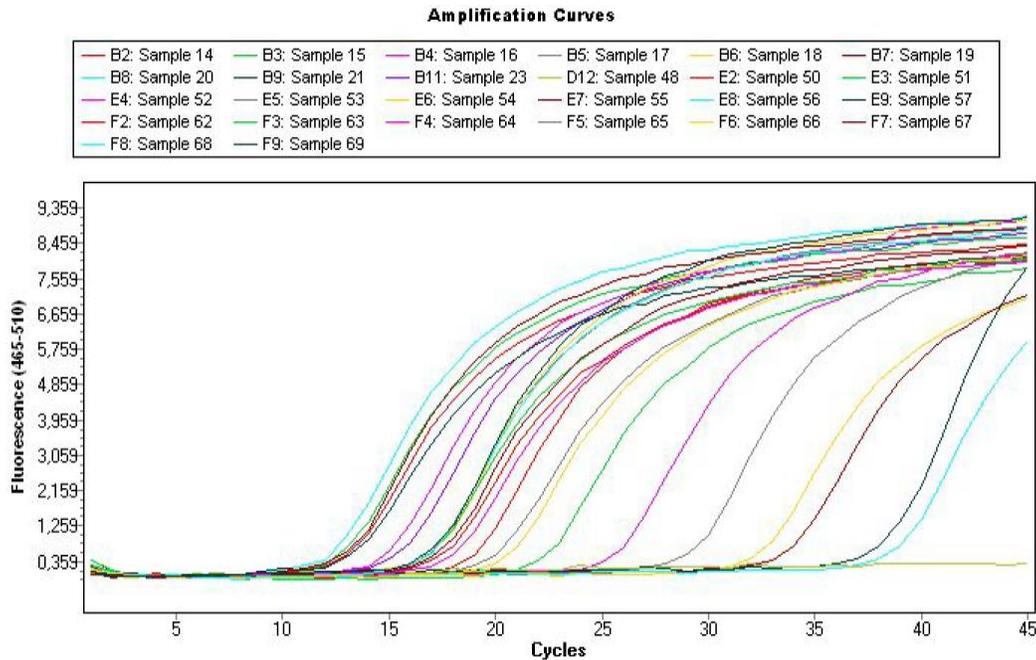


Abbildung 2.1: Exemplarische Darstellung einer quantitativen HBV PCR (Amplifikationsplot). Die einzelnen Kurven der Proben sind farblich dargestellt. Die Überschreitung der Fluoreszenzschwelle ist abhängig von der Menge des Amplifikats.

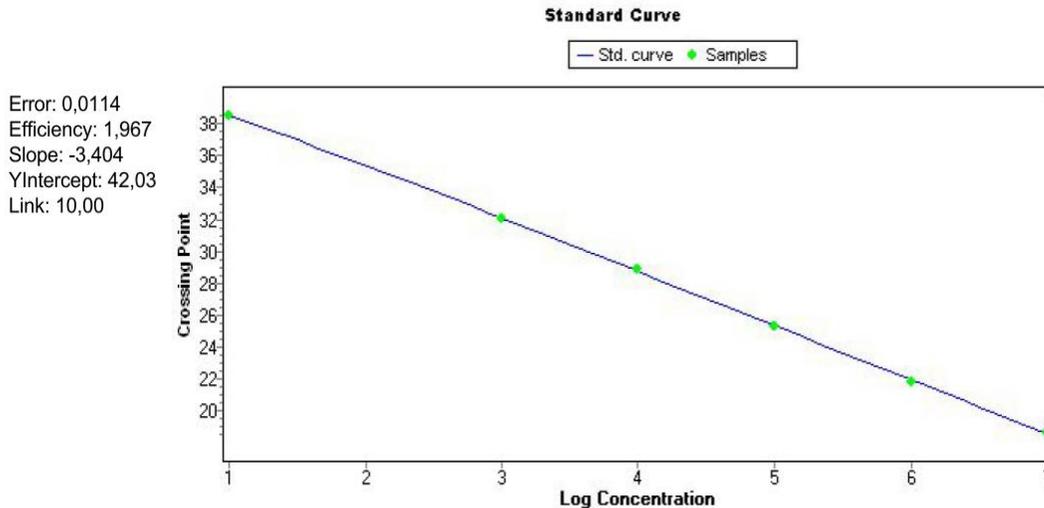


Abbildung 2.2 Darstellung einer Standardkurve ermittelt aus der Verdünnungsreihe des Plasmids pHBV 1,28. Auf der Y-Achse ist die Zyklenzahl aufgeführt, auf der X-Achse die DNA-Konzentration in Zehnerlogstufen. Die grünen Punkte stellen die Messwerte der einzelnen Proben dar.

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	50° C	2 Minuten
1	95° C	10 Minuten
45	95° C	10 Sekunden
	60° C	34 Sekunden

Tabelle 2.6 PCR-Protokoll der quantitativen PCR

2.10 Statistische Auswertung der Messdaten

In den phänotypischen Assays wurde das Verhalten der transfizierten Zellen auf ADV- oder TNV in einer Konzentrationskinetik (Kap. 2.7.2) durch Bestimmung der Viruslast mittels qPCR untersucht. Für die statistische Auswertung wurden die absoluten Kopienzahlen der HBV-DNA der Proben aus der qPCR in einer Tabelle zusammengefasst (Excel 2013, Microsoft Inc.). Aus diesen Werten wurde die relative Abnahme der behandelten im Vergleich zur unbehandelten Probe ermittelt. Die Daten der relativen Abnahme wurden dann mit dem Programm *Graph Pad Prism 7* (Graph Pad Software Inc.) weiterverarbeitet. Hier wurden die Mittelwerte der relativen Abnahme der Proben aus den verschiedenen Versuchsreihen zusammengefasst und deren Standardabweichung ermittelt. Die relative Abnahme der Viruslast in Abhängigkeit der logarithmisch aufgeführten Konzentration des Medikaments wurde grafisch in einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Zusätzlich wurde durch das Programm aus den Werten eine sigmoidale Annäherungskurve der Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet. Die Funktion für die Annäherungskurve lautet: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((X - \text{LogIC}_{50}))})$. Für *Top* wird der Wert der geringsten Inhibition durch das Medikament und für *Bottom* der Wert mit der größten Inhibition angewendet (Abb. 3). IC_{50} zeigt die Konzentration des Wirkstoffs an, an dem 50% der viralen Last gehemmt werden. Dieser wurde aus der Annäherungskurve berechnet und entspricht nicht immer dem Wert bei $Y=0,5$ (www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?REG_DR_inhibit.htm). Um zu überprüfen, ob sich die Annäherungskurve der Wildtyp-Proben von denen der Proben mit den Mutationen unterscheiden, erfolgte mit dem Programm eine statistische Testung mittels eines Extra-Quadratsummen- F-Test.

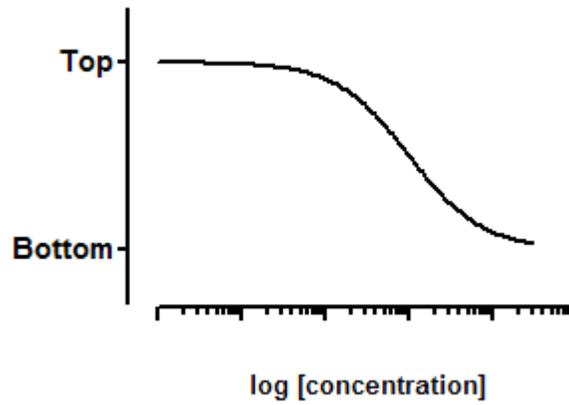


Abbildung 3 Darstellung einer Modellkurve für die Berechnung der sigmoidalen Annäherungskurve der Dosiwirkungskurve. Die Berechnung der Kurve erfolgte über die Funktion $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(X - \text{LogIC50})})$.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypische Analyse von potenziellen antiviralen Resistenzmutationen in der HBV-Polymerasedomäne von Patienten unter Adefovirtherapie

Die Rationale, die in dieser Doktorarbeit untersuchten HBV-Replikons rtT128I, rtT128N und rtN248H/E263D in einer phänotypischen Resistenzanalyse gegenüber Adefovir Dipvoxil (ADV) und Tenofovir Disoproxil (TNV) zu untersuchen, entstand aus Vorarbeiten von Walker (Walker C, 2009). In dieser Arbeit wurden anhand genotypischer Analysen eines Kollektivs von 276 Patienten mit CHB und schlechtem Ansprechen, oder Versagen auf eine ADV-Therapie mögliche Punktmutationen im HBV-Genom, die für eine antivirale Resistenz verantwortlich sein könnten, isoliert. Die Seren der Patienten wurden zwischen 2003 und 2008 gewonnen. Dabei ergab sich nach statistischer Auswertung mittels *Fisher's-Exact-Test* eine positive Korrelation von spezifischen Punktmutationen mit entweder einem verminderten virologischen Ansprechen, und/oder einem verminderten biochemischen Ansprechen. Als unzureichendes virologisches Ansprechen auf eine ADV-Therapie wurde ein Wiederanstieg der Viruslast um eine logarithmische Stufe, die aus der Viruslast vor und nach der Therapie berechnet wurde, definiert. Ein vermindertes biochemisches Ansprechen wurde als Erhöhung der Alaninaminotransferase (ALT) gewertet. Ein vermindertes virologisches Ansprechen konnte bei der in der Literatur bereits vorbeschriebenen Mutation rtN236T bestätigt werden ($p=0,04$). Zudem konnte eine positive Korrelation mit einem erneuten signifikanten Anstieg der Viruslast unter ADV-Therapie für die Mutationen an den Positionen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128N/I ($p=0,035$) und rtL231V ($p=0,015$) nachgewiesen werden. Die für diese Arbeit untersuchten Mutationen rtT128N/I konnten in 9/276 Patienten identifiziert werden. Diese Mutationen führen im S-Gen zu einer *Escape*-Mutation und besitzen dadurch bereits eine klinische Relevanz (Kap. 4.3). Eine Darstellung ausgewählter Mutationen mit ihrer Assoziation zu einem verminderten virologischen Ansprechen ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

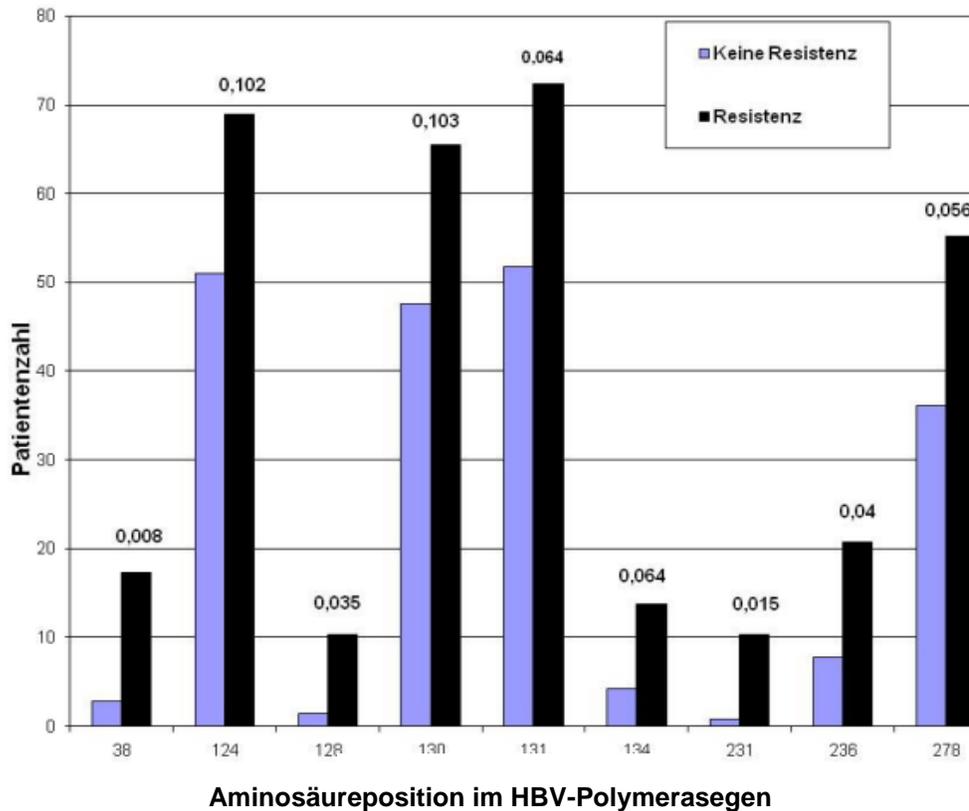


Abbildung 3.1: Ergebnisse der genotypischen Untersuchung von Walker (Walker C. 2009): Exemplarische Auswahl von detektierten Mutationen im Polymerasegen unter Berücksichtigung des Therapieansprechens. Angabe deren Häufigkeit und nach statistischer Auswertung mittels Fisher's Exact Test Angabe der p-Werte.

Keine Assoziation mit einer ADV-Resistenz ($p=0,68$), jedoch mit erhöhten ALT-Werten zeigte sich für die Punktmutation rtN248H ($p<0,0001$; $r=0,65$). Diese Mutation hatte in der statistischen Testung eine mittlere Korrelation mit einem verminderten biochemischen Ansprechen. Die in der Patientenkohorte häufig vorgefundene Punktmutation rtE263D trat in 71% in Kombination mit der Punktmutation rtN248H auf. Während rtE263D isoliert nicht assoziiert war mit einer ADV-Resistenz, könnte es sich bei der Doppelmutation rtN248H/E263D um eine kompensatorische antivirale Resistenzmutation handeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die als potenziell mit einer ADV-Resistenz assoziierten Mutationen rtT128N, rtT128I sowie die als kompensatorische Mutation gehandelte Doppelmutation rtN248H/rtE263D in einer phänotypischen Resistenzanalyse näher untersucht. Dafür wurden replikationskompetente HBV-

Plasmide (HBV-Replikons) mit oben genannten Punktmutationen mittels Klonierung generiert und in Zellkultur in HepG2-Zellen transient transfiziert. Anschließend wurde die Suszeptibilität von ADV konzentrationsabhängig auf die Virusreplikation in der Zellkultur ermittelt. Aus einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde dann der IC₅₀-Wert, d.h. der Wert, der zur einer 50-prozentigen Reduktion der viralen Last führt, berechnet. Dies erfolgte mit einem nichtlinearen Regressionsverfahren (Murakami et al, J. Inf. 2016). Dafür wurde nach Ermittlung des Höchst- und Tiefstwertes eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet. Die IC₅₀-Werte der untersuchten Mutationen wurden dann in Relation zum IC₅₀-Wert der mit einem Wildtyp-Plasmid (pHBV 1,28 (Bock *et al.*, 1999)) transfizierten Zellen gesetzt. Über einen Extra-Quadratsummen-F-Test wurde dann statistisch berechnet, ob sich die Kurven sowie die IC₅₀-Werte signifikant voneinander unterscheiden. Ferner wurde zur Verbesserung der methodischen Aussagekraft der Zellkulturversuche das Ansprechen auf ADV von Zellen untersucht, die mit HBV-Plasmiden der bekannten Resistenzmutation rtN236T transfiziert wurden ((Qi *et al.*, 2007)(Brunelle *et al.*, 2005)). Um zu untersuchen, ob die mit einer ADV-Resistenz in Assoziation gebrachten, oben genannten Mutationen auf eine Alternativbehandlung mit TNV ansprechen würden, wurde in einer weiteren Untersuchung aus mit TNV behandelten Zellkulturassays der IC₅₀-Wert bei den Mutationen rtT128N, rtT128I ermittelt und in Relation mit dem IC₅₀-Werts des Wildtyps (Wt) gesetzt.

3.2 Generierung replikationskompetenter HBV-Plasmide mit Punktmutationen rtT128N und rtT128I

Die für die phänotypische Resistenzanalyse notwendigen HBV-Plasmide mit den Punktmutationen rtT128I und rtT128N im HBV-Polymerasegen wurden in einem ersten Schritt hergestellt (Kap. 2.6). Da bei der genotypischen Analyse bei allen Patienten, bei denen die Mutationen T128I/N nachgewiesen wurde, der Genotyp D vorgefunden wurde, wurde als replikationskompetenter Vektor und HBV-Replikon der HBV-Genotyp D ausgewählt. Die entsprechenden Punktmutationen wurden in das HBV-Polymerasegen durch eine *site directed mutagenesis* über

den pGEM-T-Easy-Klonierungsvektor eingebracht. Das mutierte Polymerasegen wurde dann über einen Kassettenaustausch in Wt-Replikon pHBV 1,28 eingefügt (Bock *et al.*, 1999). In der unten aufgeführten Abbildung 3.2 ist die Plasmidkarte des HBV-Wt-Genoms des Wt-Replikons pHBV 1,28 dargestellt. Die neuen HBV-Replikons pHBV rtT128I/N beinhalten das HBV-Polymerasegen mit den Punktmutationen T128I/N, welches mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NcoI an den entsprechenden Schnittstellen ins HBV-Genom ligiert wurde. Nach Herstellung der Replikons pHBV rtT128I/N erfolgte eine Sequenzierung des Polymerasegens um zu kontrollieren, ob die Punktmutation in das Genom erfolgreich eingefügt wurde. In Abbildung 3.3 sind die Sequenzabschnitte des Polymerasegens mit den Punktmutationen rtT128I und rtT128N dargestellt. Zum Vergleich werden Wt-Sequenzen unter anderem vom Genotyp D aufgezeigt.

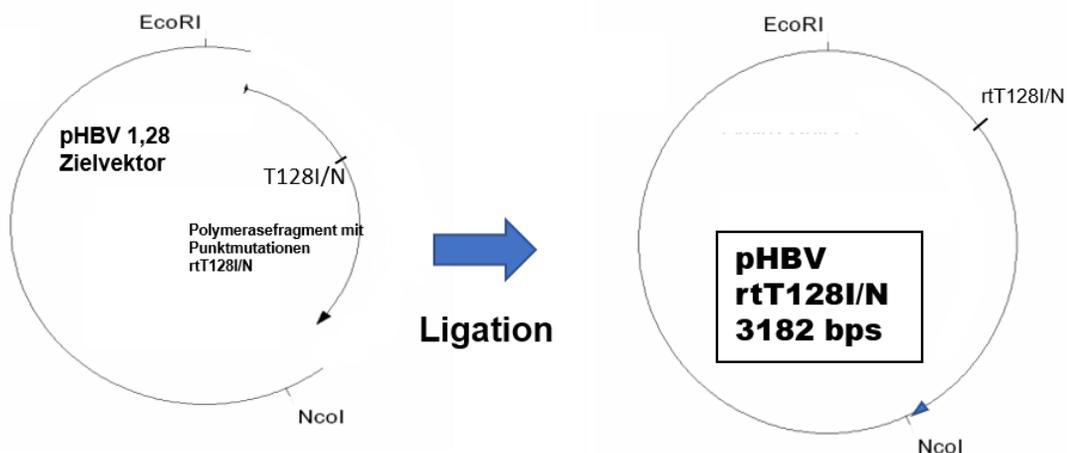


Abbildung 3.2: Plasmidkarte und schematische Darstellung des HBV Wiltpzvektoriellvektors sowie das Polymerasefragment mit den eingefügten Punktmutationen T128I/N (links). Das Polymerasefragment mit der Punktmutation wurde zuvor durch site directed mutagenesis kloniert und aus dem pGEM T Klonierungsvektor per Restriktionsverdau an den Restriktionsstellen EcoRI und NcoI ausgeschnitten. Nach Ligation der beiden Fragmente entsteht das HBV-Replikon pHBV T128I/N mit einer Länge von 3182 Basenpaare (bps) (rechts).

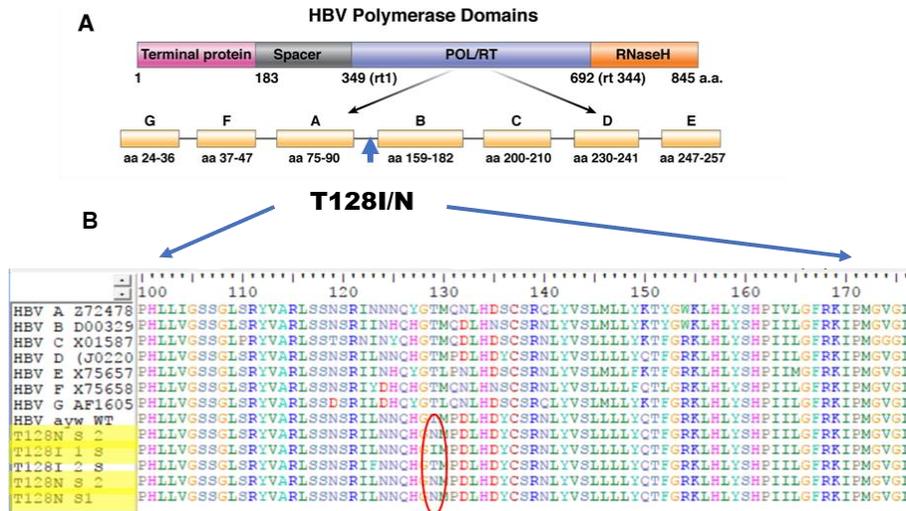


Abbildung 3.3: A: exemplarische Darstellung der Domänen des HBV Polymerase Gens (modifiziert nach Ghany 2007). Die Stelle der Punktmutationen T128I/N sind mit einem Pfeil markiert. B: Alignments der sequenzierten Mutantplasmide im Polymerasegen. In den oberen Reihen sind Sequenzen von Wildtpen verschiedener Genotypen aufgeführt. In den gelb markierten Zeilen Sequenzabschnitten der Mutantplasmide, kann man den erfolgreichen Nukleotidaustausch, eingekreist, an der 128.sten Stelle im Polymerasegen von Threonin zu Isoleucin bzw Asparagin (Man beachte, dass beim Plot-Alignment die Sequenz um eine Stelle nach vorne verschoben ist).

3.2.1 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil bei mit Wildtyp pHBV 1,28 transfizierten HepG2-Zellen

Um die Suszeptibilität der potenziellen Resistenzmutationen rtT128I, rtT128N und rtN248H/E263D phänotypisch zu untersuchen, erfolgte die Behandlung von mit HBV-Replikons transfizierten Zellen mit ADV. Als Referenzkontrolle der phänotypischen Analysen der zu untersuchenden Mutationen rtT128I, rtT128N, der Doppelmutation rtN248H/E263D sowie der Resistenzmutation rtN236T, diente ein Zellkulturassay mit dem Wt-Replikon pHBV 1,28 (Genotyp D). Das Replikon pHBV 1,28 wurde in den Zellkulturversuchen parallel zu den mutierten Replikons als Kontrolle eingesetzt. Für die Analysen wurden, wie beschrieben (Kap.2.7.1) in Zellkultur HepG2-Zellen mit dem Wt-Replikon transfiziert und mit aufsteigenden ADV-Konzentrationen behandelt. Als Konzentrationen von ADV wurden 0µM, 5µm,10µM, 20µM oder 50µM gewählt. Die Behandlung erfolgte über 6 Tage (Kap.2.6.2). Nach Zellernte wurde die HBV-DNA aus den Zellen isoliert und mittels quantitativer *real time* PCR (qPCR) die Kopienanzahl der HBV-DNA ermittelt (Kap.2.8). In der daraus ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurve sollte dann der IC50-Wert ermittelt werden. Die in der qPCR eingesetzten Proben

aus den Zellkulturversuchen wurden im Minimum in Duplikaten gemessen. Insgesamt ergaben sich daraus 38 Messwerte. Um die relative Abnahme der Viruslast zu ermitteln, wurde die dosisabhängige Viruslast in Relation gesetzt mit der Viruslast der unbehandelten Probe. Die Durchschnittswerte der Viruslasten unter entsprechender ADV-Dosis wurden in der Dosis-Wirkung-Kurve aufgetragen und sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Die relative Abnahme der HBV-Replikation bei den Experimenten unter ADV-Therapie entsprach einem nicht linearen, sigmoidalen Verlauf und zeigte ein erwartetes Ansprechen auf ADV. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde über eine nichtlineare Regressionsanalyse eine angenäherte Funktion ermittelt. Dafür wurden die Konzentrationen von ADV in logarithmische Werte umgewandelt. Der daraus ermittelte IC₅₀-Wert zeigte eine 50%ige Abnahme der Viruslast bei 1,4 µM (Log=-5,855). Bei der höchsten Konzentration von 50 µM zeigte sich erstaunlicherweise eine moderate Zunahme der Viruslast. Dieses Phänomen wurde in der Arbeit von Walker bereits beschrieben, allerdings dort schon bei einer niedrigeren Dosierung von 20µM ADV. Als mögliche Ursache wurde eine „*high-zone tolerance*“ beschrieben (Walker, 2009).

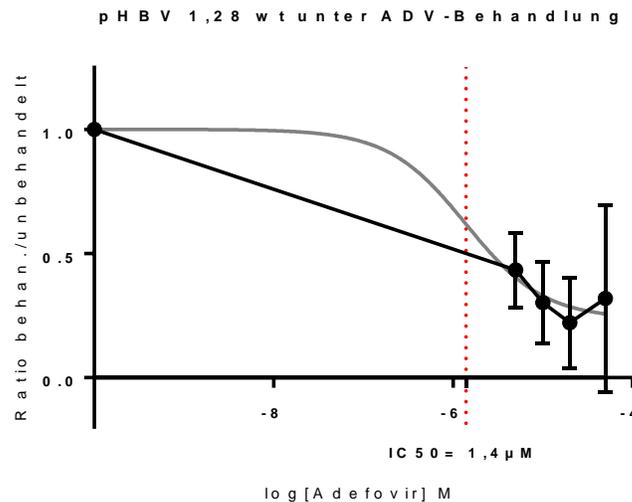


Abbildung 3.4: Dosis-Wirkungs-Kurve der HepG2-Zellkulturexperimente mit dem Wt-Replikon pHBV 1,28 unter konzentrationsabhängiger Behandlung mit ADV (schwarz). Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken) dar. Die Konzentrationen von ADV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und auf der X-Achse aufgeführt. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nichtlinearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (grau). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei Log -5,86 liegt, was einer Konzentration von 1,4 µM entspricht (X-Achse).

3.2.2 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der Resistenzmutation rtN236T in transfizierten HepG2-Zellen

Die Polymerasemutation rtN236T ist in der Literatur sowohl in geno- als auch phänotypischen Analysen als Resistenzmutation beschrieben (Angus, Vaughan et al. 2003; Villeneuve, Durantel et al. 2003). Während die Zellkulturexperimente mit dem Wt-Replikon pHBV 1,28 als Kontrolle für eine hohe Suszeptibilität für ADV diente, wurde in den folgenden Experimenten mit der Polymerasemutation rtN236T eine Kontrolle für eine verminderte Suszeptibilität etabliert. Hierfür wurden in Zellkultur HepG2-Zellen mit dem HBV-Replikon pHBV rtN236T transfiziert, dass die Resistenzmutation rtN236T beinhaltet. Das HBV-Replikon pHBV rtN236T wurde in der Vorarbeit kloniert (Walker, 2009). Anschließend erfolgte eine Behandlung ADV in den Konzentrationen 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM oder 50 μM für 6 Tage. Nach erfolgter Zellernte und HBV-DNA-Isolation erfolgte die Bestimmung der Viruslast mittels qPCR (Kap. 2.8). Die Berechnung des IC₅₀-Wertes erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse (Abb. 3.5). Die gezeigte Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte eine gute Übereinstimmung mit der durch die Regressionsanalyse berechneten Annäherungskurve (Abb. 3.5). Im Vergleich zur Kontrolle mit dem Replikon pHBV 1,28 zeigte sich ein signifikant verzögertes Ansprechen auf die Therapie (Abb. 3.5). Aus 12 Messreihen, die als Duplikate in der qPCR (Kap. 2.8) gemessen wurden, ergab sich in der angenäherten Funktion ein IC₅₀-Wert von 12,5 μM (log-4,903). Dies entspricht, wie erwartet, einem 8,9-fachen Wert im Vergleich zum Wt. Somit konnte in diesen Zellkulturexperimenten ein deutlich vermindertes Ansprechen der Resistenzmutation rtN236T auf ADV nachgewiesen werden. Mittels statistischer Testung wurde untersucht, ob sich die Annäherungskurven und die IC₅₀-Werte des Wt und der Mutation rtN236T signifikant voneinander unterscheiden (Kap. 2.9). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl für die Kurve, als auch für die IC₅₀-Werte der Mutation rtN236T im Vergleich zum Wt (p-Wert < 0,001; 95% Konfidenzintervall: log-5,137 bis log-4,645) (Abb. 3.6). Die hier gezeigten Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen aus den Vorarbeiten (Walker, 2009)

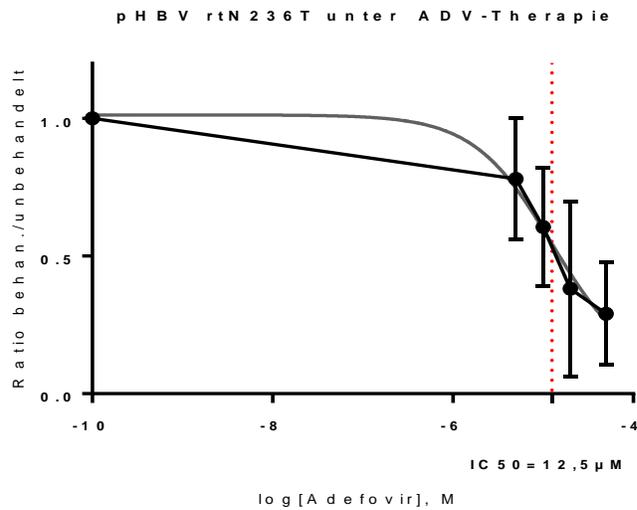


Abbildung 3.5: Dosis-Wirkungskurve aus den HepG2-Zellkulturexperimenten mit der bekannten Resistenzmutation gegen Adefovir Dipivoxil rtN236T unter Behandlung mit ADV. Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken) dar (schwarz). Die Konzentrationen von ADV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei Log -4,903 liegt und einer Konzentration von 12,5 µM entspricht (X-Achse).

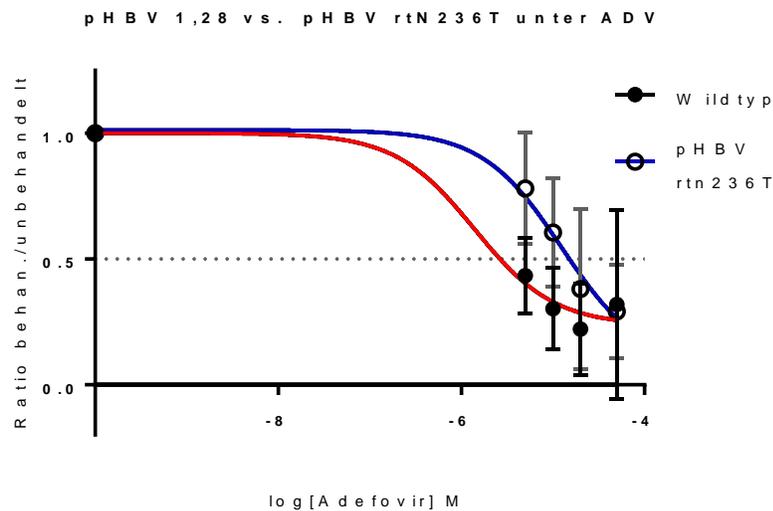


Abbildung 3.6: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der Resistenzmutation rtN236T (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von Adefovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Die Kreise markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen Adefovirkonzentrationen für Wildtyp (schwarz) und der Mutation rtN236T (weiß). Die Standardfehler sind als Balken an den Messfehlern angezeigt. Nach Extra-Quadratsummen F-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Kurven und der IC₅₀-Werte ($p < 0,001$; 95%CI (log-5,137 bis log-4,645 \pm 1µM bis 2µM)

3.3.3 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der potenziellen Resistenzmutation rtT128I in transfizierten HepG2- Zellen

Nach genotypischer Analyse zeigte sich bei der Polymerasemutation rtT128N/I (n=9/276) eine signifikante Korrelation mit einem unzureichenden virologischen Ansprechen auf eine ADV-Therapie ($p=0,035$). Ein Ziel in dieser Arbeit war es, die unzureichende Suszeptibilität der rtT128I Mutation zu ADV in phänotypischen Untersuchungen zu bestätigen. Für die Versuche wurden Zellkulturen mit dem zuvor klonierten Replikon, welches die Polymerasemutation rt128I beinhaltet, transient in HepG2-Zellen transfiziert und mit ADV-Konzentrationen von $0\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ oder $50\mu\text{M}$ für 6 Tage behandelt. Es wurden jeweils 8 Messwerte in Duplikaten gemessen. Die aus der Viruslast unter vorher genannten Dosierungen ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Sie zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Annäherungskurve, die durch nichtlineare Regressionsanalyse erstellt wurde. Aus der abgeleiteten Funktion dieser Kurve konnte ein IC_{50} -Wert von $5,1\ \mu\text{M}$ ($\log -5,924$) ermittelt werden. Dies entspricht dem 3,6-fachen Wert im Vergleich zum Wt und im Vergleich zur Resistenzmutation rtN236T einen weniger verzögerten Effekt auf die Senkung der Viruslast (3,6-fach vs. 8,9-fach). Beim statistischen Vergleich der Annäherungskurve des Wt mit der der Punktmutation rtT128I, welcher in Abbildung 3.8 dargestellt ist, konnte nach einem Extra-Quadratsummen- F-Test ein signifikanter Unterschied der IC_{50} -Werte des Wt und der Punktmutation gezeigt werden ($p=0,0025$; $95\%CI$ ($\log -5,856$ bis $\log -5,476$)). Zu bemerken ist, dass die Sensitivität der Punktmutation bei der höchsten verabreichten ADV-Dosis von $50\mu\text{M}$ geringer ist als beim Wildtyp. Dies ist wahrscheinlich auf die unerwartete Zunahme der Viruslast des Wt unter dieser Dosis zurück zu führen. Der in den genotypischen Untersuchungen gezeigte Zusammenhang der Punktmutation rtT128I mit einem schlechten Ansprechen auf eine ADV-Therapie konnte hiermit auch in den phänotypischen Untersuchungen bestätigt werden.

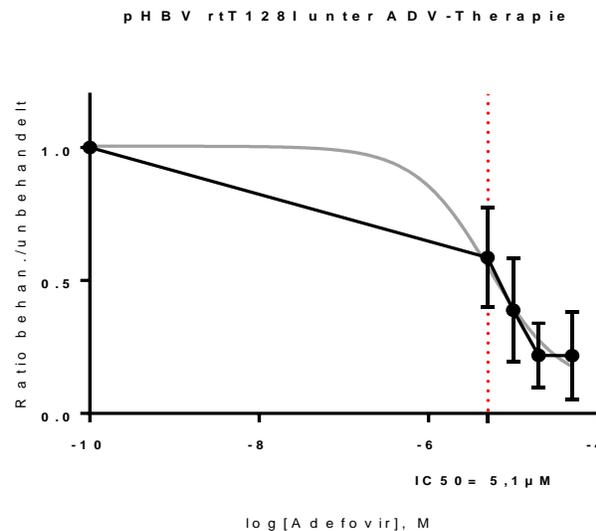


Abbildung 3.7: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellkulturexperimenten mit der vermuteten Resistenzmutation gegen ADV rt128I unter Behandlung mit ADVI. Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken) dar (schwarz). Die Konzentrationen von Adefovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoide Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei Log -4,903 liegt und einer Konzentration von 5,1 µM entspricht (X-Achse).

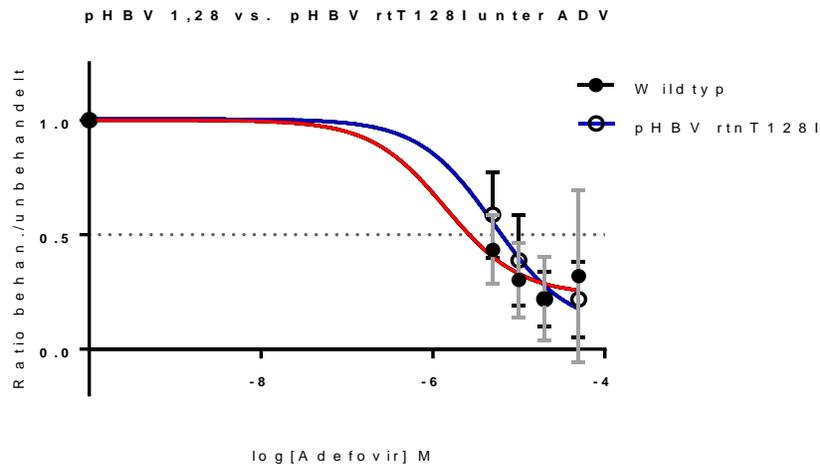


Abbildung 3.8: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der vermuteten Resistenzmutation rt128I (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von ADV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Die Kreise markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen Adefovirkonzentrationen für Wildtyp (schwarz) und Mutante rt T128I (weiß). Nach Extra-Quadratsummen F-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Kurven und der IC₅₀-Werte ($p=0,0025$; 95%CI (log-5,856 bis log -5,476)).

3.3.4 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil der potenziellen Resistenzmutation rtT128N in transfizierten HepG2- Zellen

Um die Suszeptibilität von HBV-Replikons mit der Punktmutation rtT128N zu untersuchen, wurden HepG2-Zellkulturen mit dem zuvor klonierten Replikon,

welches die Polymerasemutation rt128N beinhaltet, transient transfiziert und mit ADV-Konzentrationen von 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M oder 50 μ M für sechs Tage behandelt. Aus 8 Duplikaten wurde die Viruslast per qPCR (Kap. 2.8) ermittelt. Die aus der Viruslast ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp leichtgradig niedrigere Abnahme der Viruslast in den Dosierungen bis 10 μ M und ab 20 μ M eine höhere Abnahme (Abb.3.10). Die Dosis-Wirkungskurve ist in Abbildung 3.9 mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Mit der durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelten Funktion konnte ein IC₅₀-Wert von 4,2 μ M bestimmt werden (log -5,372). Dies entspricht einem 3-fach verminderten Ansprechen auf ADV im Vergleich zum Wt. Bei der statistischen Testung mittels Extra-Quadratsummen- F-Test, zur Ermittlung der Unterschiede der IC₅₀-Werte der beider Kurven, zeigte sich ein signifikanter Unterschied von pHBV 1,28 und pHBV rtT128N (p-Wert von 0,0062; 95% Konfidenzintervall von log -5,853 bis log -5,494). Der Vergleich der Annäherungskurven ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

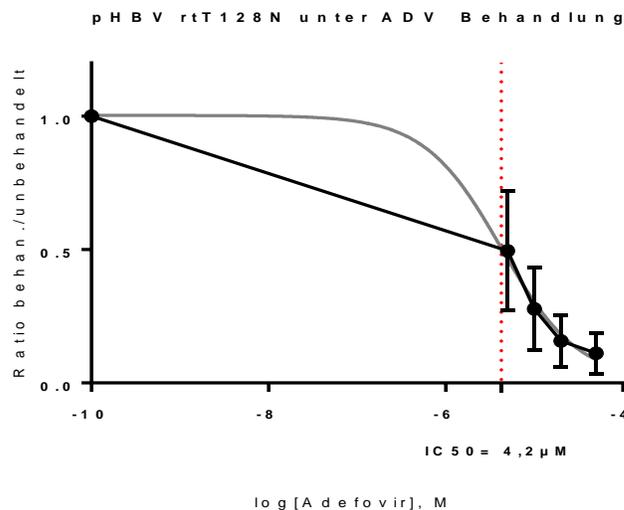


Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellkulturexperimenten mit der vermuteten Resistenzmutation gegen ADV, rtT128N, unter Behandlung mit ADV. Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken; schwarz). Die Konzentrationen von Adefovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei Log -5,372 liegt, einer Konzentration von 4,2 μ M entspricht (X-Achse).

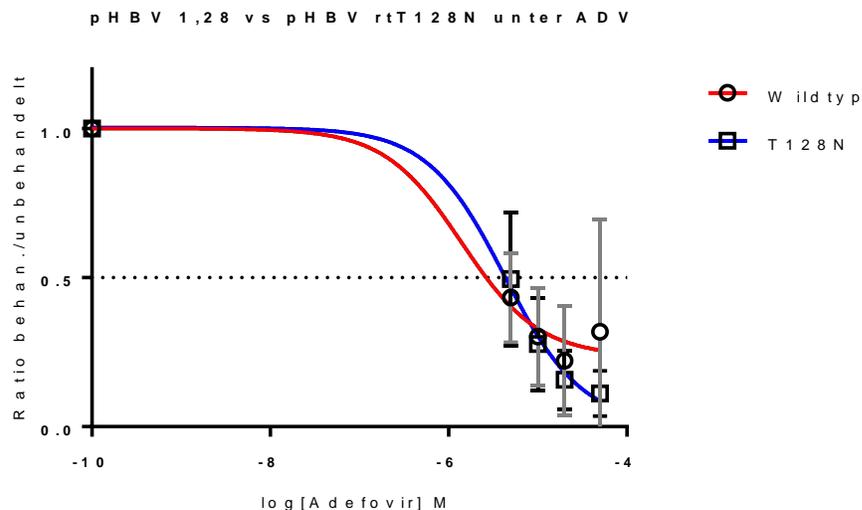


Abbildung 3.10: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der Resistenzmutation rt128N (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von Adefovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Die Symbole markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen ADV-Konzentrationen für Wildtyp (schwarz) und Mutante rt T128N (weiß) mit Standardabweichung (Balken). Nach Extra-Quadratsummen F-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Kurven und der IC_{50} -Werte ($p < 0,0062$; 95%CI log -5,853 bis log -5,494)

3.3.5 Suszeptibilität für Adefovir Dipivoxil in mit pHBV rtN248H/rtE263D transfizierten HepG2-Zellen

In den genotypischen Analysen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit einem verminderten biochemischen Ansprechen der Patienten unter ADV-Therapie mit der Punktmutation rtN248H ermittelt werden (Korrelationskoeffizient $r=0,64$, $p < 0,0001$) (Walker, 2009). Weiterhin konnte dort ein Zusammenhang mit einem verminderten virologischen Ansprechen in der phänotypischen Analyse mit einem 4-fach verminderten Senkung der Viruslast gegenüber dem Wildtyp auf eine ADV-Behandlung gezeigt werden. Diese Punktmutation konnte in 97/276 Patienten identifiziert werden. In 71% der Fälle trat die Mutation in Kombination mit der Punktmutation rtE263D auf. Anzumerken ist, dass diese Einzelmutation in keinem statistischen Zusammenhang mit einem Therapieversagen stand. Als Erklärung für diese Assoziation wurde eine mögliche Funktion als kompensatorische Mutation, die eine Verbesserung der viralen Fitness bewirkt, vermutet (Walker, 2009). Um einen möglichen zusätzlichen Effekt auf die Suszeptibilität von HBV-Replikons mit der

Doppelmutation rtN248H/rtE263D auf ADV zu untersuchen, wurden HepG2-Zellkulturen mit dem zuvor klonierten HBV-Replikon, welches die Polymerasemutation rtN248H/rtE263D beinhaltet, transient transfiziert und mit ADV-Konzentrationen von 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM oder 50 μM für sechs Tage behandelt. Die HBV-Replikons mit der Doppelmutation wurden in Vorarbeiten kloniert (Walker, 2009). Die Viruslast wurde mittels qPCR (Kap 2.8) in 9 Duplikaten gemessen und die Mittelwerte der relativen Abnahme im Vergleich zur unbehandelten Probe inklusive Standardabweichung in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte ein allenfalls leicht vermindertes Ansprechen auf ADV im Vergleich zum Wt-Replikon pHBV 1,28. Die über Regressionsanalyse berechnete Annäherungsfunktion zeigte einen IC_{50} -Wert von 3,3 μM . Dies entspricht dem 2,4-fachen Wert im Vergleich zum Wt. Die Annäherungskurven sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Kurven. In der statistischen Testung mittels Extra-Quadratsummen- F-Test um einen signifikanten Unterschied der IC_{50} -Werte zu überprüfen, konnte ein nicht signifikanter Unterschied der Werte zwischen pHBV rtN248H/rtE263D und pHBV 1,28 gezeigt werden ($p=0,0623$; 95% *Konfidenzintervall*: $\log -5,945$ bis $\log -5,544$). Somit konnte eine mögliche Funktion der Mutation rtE263D als kompensatorische Mutation von rtN248H in diesen Versuchen nicht bestätigt werden.

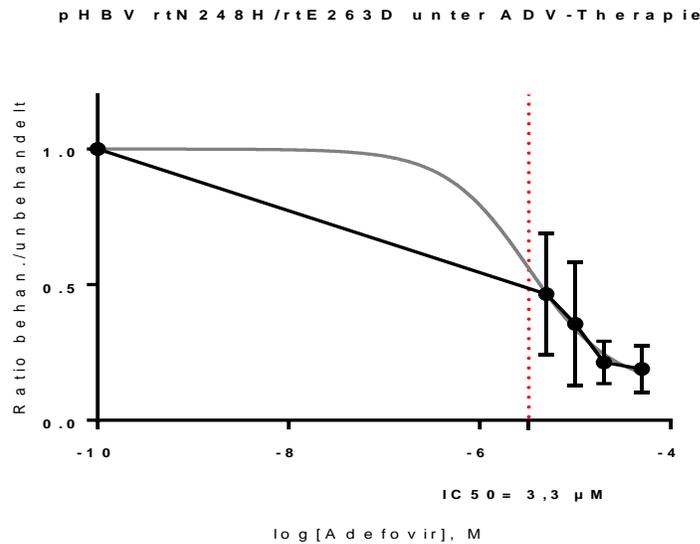


Abbildung 3.11: Dosis-Wirkungskurve aus den HepG2-Zellkulturversuchen mit der vermuteten Resistenzmutation gegen ADV, rtT128N, unter Behandlung mit Adefovir Dipivoxil. Die Messpunkte sind die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken, schwarz). Die Konzentrationen von ADV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei log -5,372 liegt, einer Konzentration von 4,2 µM entspricht (X-Achse).

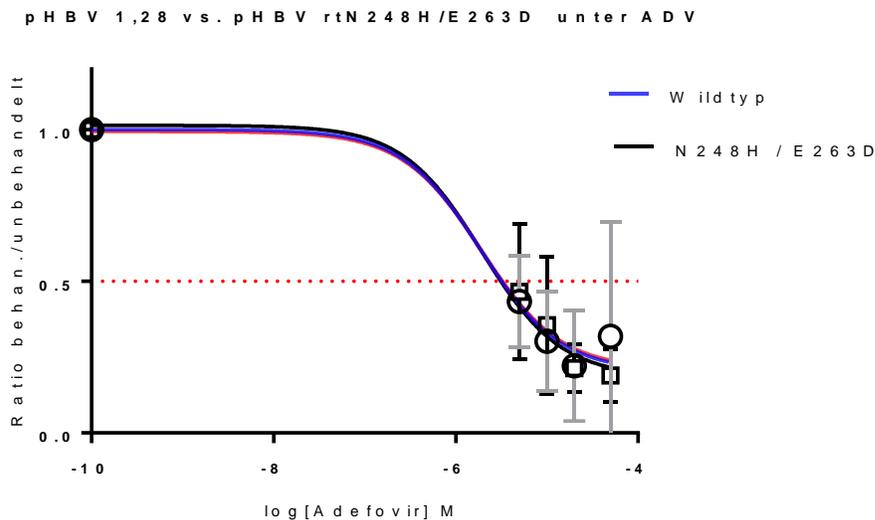


Abbildung 3.12: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (blaue Kurve) und der Resistenzmutation rtN248H/E263D (schwarze Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von Adefovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse mit den Standardabweichungen (Balken) aufgeführt. Die Symbole markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen Adefovirkonzentrationen für Wildtyp (schwarz) und Mutante (weiß). Nach Extra-Quadratsummen F-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Kurven und der IC₅₀-Werte ($p=0,0623$; 95%CI log -5,945 bis log-5,544).

3.4.1 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit Wiltyp-Replikon pHBV ayw 1,28 transfizierten HepG2-Zellen

Laut aktuellen klinischen Empfehlungen stellt eine Monotherapie mit TNV oder Entecavir, oder deren Kombinationstherapie, bei Therapieversagen unter Therapie mit ADV eine Alternative dar (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012). Klinische Daten zeigen, dass bei CHB-Patienten, bei denen nach ADV-Therapie ein Therapieversagen unter Nachweis der Resistenzmutation rtN236T entwickelt haben, eine Therapie mit TNV zu einer erneuten suffizienten Abnahme der Viruslast und Normalisierung der Transaminasen geführt hat (Wang *et al.*, 2015). Einige Daten weisen darauf hin, dass das Ansprechen unter einer Monotherapie mit TNV zu einem verminderten antiviralen Effekt führen würde und schlagen alternativ die Kombinationstherapie von TNV mit Emtricitabine vor (Tan *et al.*, 2008). *In-vitro*-Studien, die das Ansprechen von TNV auf die Resistenzmutation N236T untersucht haben, zeigten ein 2-5-fach vermindertes Ansprechen (Murakami *et al.*, 2016).

In einem nächsten Schritt dieser Arbeit sollte bei den potenziellen ADV-Resistenzmutationen rtT128I und rtT128N untersucht werden, ob diese auf eine Behandlung mit TNV suszeptibel sind und dadurch eine mögliche Alternativtherapie aufgezeigt werden kann. Hierfür wurden analog zu den Vorversuchen mit ADV zunächst in der HepG2-Zellkultur mit dem Wt-Replikon pHBV 1,28 transfizierte Zellen mit TNV für sechs Tage behandelt und die Abnahme der Viruslast ermittelt (Kap2.7). Als Konzentrationen von TNV wurden 0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM oder 50 μM gewählt. Insgesamt gab es neun Proben. Nach Zellernte wurde die HBV-DNA aus den Zellen isoliert und mittels qPCR die Kopienzahl der HBV-DNA ermittelt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve aus den Mittelwerten der relativen Abnahme im Vergleich zur unbehandelten Probe mit dem HBV-Replikon pHBV 1,28 ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Ergebnisse aus der qPCR-Messung ergeben eine sehr gute Suszeptibilität des Wt auf TNV. Die mittels nichtlinearer Restriktionsanalyse berechnete Annäherungsfunktion zeigte einen IC_{50} -Wert von 0,6 μM ($\log=-6,025$). Im Vergleich zur IC_{50} von ADV ($\text{IC}_{50}=1,4 \mu\text{M}$), ist die IC_{50} von TNV deutlich niedriger (2,3-fach), was auf die höhere antivirale Potenz von TNV deutet.

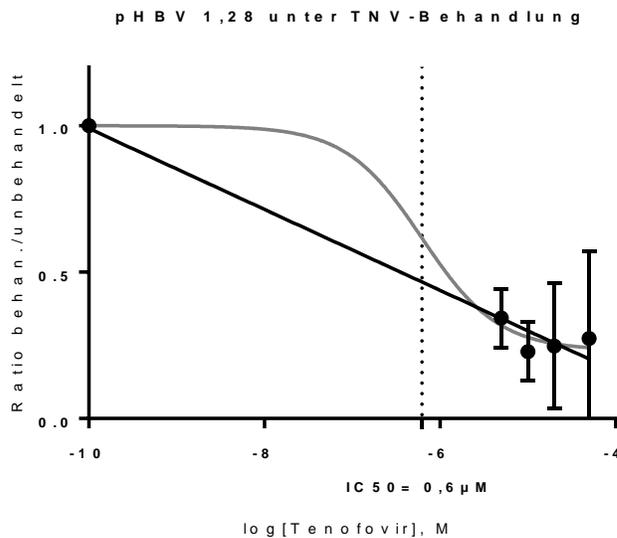


Abbildung 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellkulturexperimenten mit dem Wildtyp unter Behandlung mit TNV. Die Messpunkte sind die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (Balken, schwarz). Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, welcher bei Log -6,025 liegt, einer Konzentration von 0,6 µM entspricht (Linie auf X-Achse).

3.4.2 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBV rtN236T transfizierten HepG2- Zellen

In-Vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass die in Genotyp A- oder C-Stämmen integrierte Einzelmutation rtN236T zu einem 2-5-fach verminderten Ansprechen auf eine TNV-Therapie führt (Murakami *et al.*, 2016).

Klinische Daten bestätigen jedoch eine Wirksamkeit von TNV in einem Patientenkollektiv, welches zuvor unter ADV ein Therapieversagen entwickelt hatte (Berg 2010, 2014). Detaillierte Untersuchungen zu diesem Kollektiv zeigten eine Prävalenz der Mutation rtN236T von 15%. Hinsichtlich des antiviralen Effekts von TNV zeigten die Patienten mit der Punktmutation rtN236T keinen Unterschied zu denen, die die Mutation nicht trugen. Um das Verhalten der Polymerasemutation rtN236T beim Genotyp D auf TNV zu untersuchen, wurden in Zellkulturen mit dem Replikon pHBV rtN236T transient transfizierte Zellen mit 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM oder 50 µM TNV für sechs Tage behandelt (Kap.2.7). 4 Messungen wurden als Duplikate in der qPCR gemessen, deren Mittelwerte in Abbildung 3.14 dargestellt sind. Die mit der aus der Dosis-Wirkungs-Kurve durch

nichtlineare Regressionsanalyse ermittelte Annäherungsfunktion zeigte einen IC_{50} von $8,1 \mu\text{M}$ ($\log=-5,093$), der deutlich über dem des Wildtypreplikons pHBV 1,28 lag und verglichen zu diesem eine 13,5-fach verminderte Sensitivität aufzeigte. Damit bestätigt sich der in *in-vitro*- Versuchen gezeigte Effekt, der in der Literatur beschrieben ist, einer verringerten Effektivität von TNV bei der Mutation rtN236T. In der statistischen Analyse mittels Extra Quadratsummen F-Test zeigte ein signifikanter Unterschied der Annäherungskurven von pHBV 1,28 und pHBV rtN236T (p -Wert $<0,0001$; 95% Konfidenzintervall: unbekannt bis $\log -5,23$), jedoch nicht der IC_{50} -Werte ($p=0,089$; 95% Konfidenzintervall: unbekannt bis $\log-5,43$). In Anbetracht der weit auseinanderliegenden IC_{50} -Werte ist dieses unerwartete Ergebnis wahrscheinlich durch die geringe Probenzahl mit relativ hoher Standardabweichung bedingt.

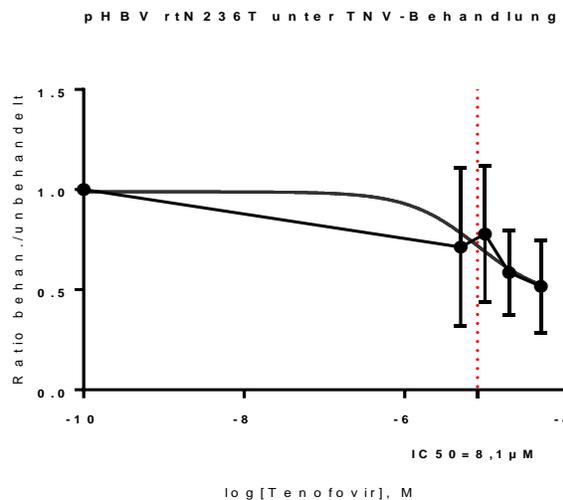


Abbildung 3.14: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellkulturexperimenten mit der Resistenzmutation gegen ADV rtN236T unter Behandlung mit ADV. Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung dar (schwarze Balken). Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC_{50} -Wert ermittelt, welcher bei $\text{Log } -5,093$ liegt, einer Konzentration von $8,1 \mu\text{M}$ entspricht (rote Linie auf X-Achse).

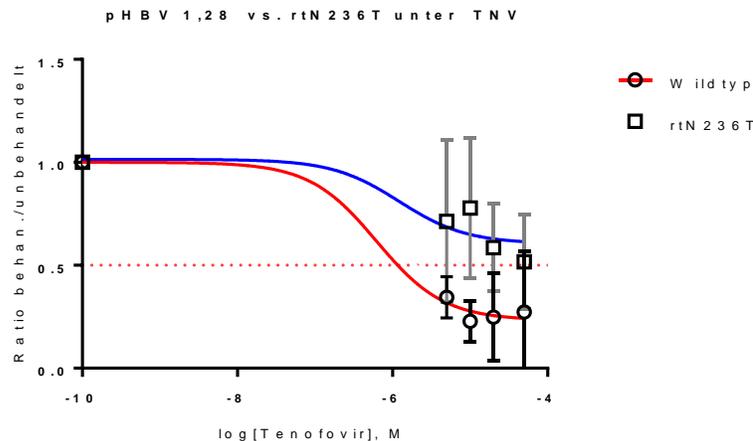


Abbildung 3.15: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der Resistenzmutation rtN236T (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Die Symbole markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte mit Standardabweichung (Balken), bei den jeweiligen TNV-Konzentrationen für Wildtyp (schwarz) und Mutante (weiß). Nach Extra-Quadratsummen F-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Kurven ($p < 0,0001$ 95% CI: unbekannt bis log -5,23), jedoch nicht der IC_{50} -Werte ($p < 0,0887$; 95%CI: unbekannt bis log-5,43).

3.4.3 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBV rtT128I transfizierten HepG2-Zellen

Die in der genotypischen Analyse gezeigte Assoziation der Punktmutation rtT128I in der HBV-Polymeraseregion mit einem verminderten Ansprechen auf eine antivirale Therapie mit ADV konnte in dieser Arbeit in der phänotypischen Analyse bestätigt werden. Dort zeigte sich ein 3,6-fach vermindertes Ansprechen der Mutante auf ADV, was einer moderat verminderten Suppression der HBV-Replikation entspräche. Um eine mögliche Therapieoption für Patienten mit dieser Mutation aufzuzeigen, wurde in HepG2-Zellkulturen die Mutation auf das Ansprechen auf TNV untersucht. Dafür wurden in Zellkulturen mit dem HBV-Replikon pHBV rtT128I transient transfizierte Zellen mit 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M oder 50 μ M TNV für sechs Tage behandelt. Vier Proben wurden in Duplikaten in der qPCR gemessen. Die aus den Mittelwerten der relativen Abnahme im Vergleich zur unbehandelten Probe entstandene Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 3.16 abgebildet. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Viruslast, vergleichbar mit der des Wt. Der aus der Annäherungsfunktion nach

nichtlinearer Regressionsanalyse berechnete IC_{50} - Wert lag bei $0,006 \mu\text{M}$ und zeigte somit eine höhere Sensitivität auf die antivirale Therapie als der Wt, wobei aufgrund der wenigen Messwerte mit relativ hoher Standardabweichung hier der errechnete IC_{50} -Wert nicht plausibel erschien. Alternativ erfolgte daher eine lineare Regressionsanalyse. In der dort ermittelten Annäherungsgeraden konnte ein IC_{50} -Wert von $0,7 \mu\text{M}$ ($\log = -6,1572$) berechnet werden. Dieser Wert war kompatibler mit der Dosis-Wirkungs-Kurve, als der Wert aus der nichtlinearen Regressionsanalyse und war mit der des IC_{50} des Wt vergleichbar. Eine statistische Testung mit Extra Quadratsummen F-Test war ebenfalls aufgrund der kleinen Probenanzahl nicht durchführbar. In Abbildung 3.16 sind beide nicht linearen Annäherungskurven aufgeführt. Hier zeigt sich eine ähnliche Steigung beider Kurven sowie eine deutliche Überlappung der Standardabweichung, sodass davon ausgegangen werden könnte, dass sich die IC_{50} -Werte von pHBV 1,28 und pHBV rtT128I unter TNV nicht signifikant voneinander unterscheiden

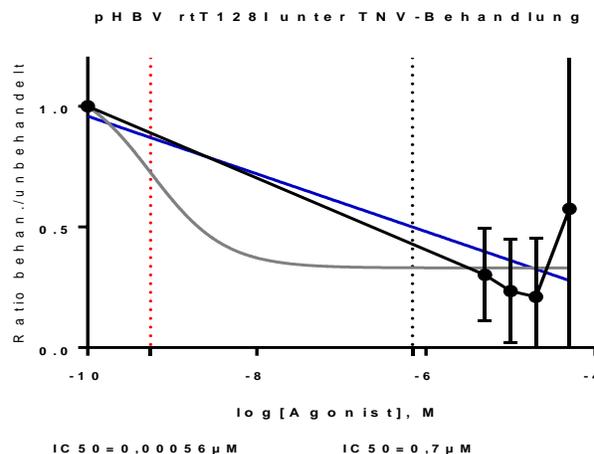


Abbildung 3.16: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellexperimenten mit der Resistenzmutation gegen ADV rtT128I unter Behandlung mit TNV. Die Messpunkte sind die jeweiligen Durchschnittswerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (schwarze Balken). Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt und werden auf der X-Achse aufgeführt. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nicht linearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoidale Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC_{50} -Wert ermittelt, welcher bei $\text{Log } -6,025$ liegt, einer Konzentration von $0,0006 \mu\text{M}$ entspricht (rote Linie auf X-Achse). Alternativ wurde eine lineare Regression durchgeführt, deren Gerade in Blau dargestellt ist. Der IC_{50} -Wert aus dieser Funktion zeigte einen IC_{50} -Wert bei $0,7 \mu\text{M}$ (graue Linie auf X-Achse).

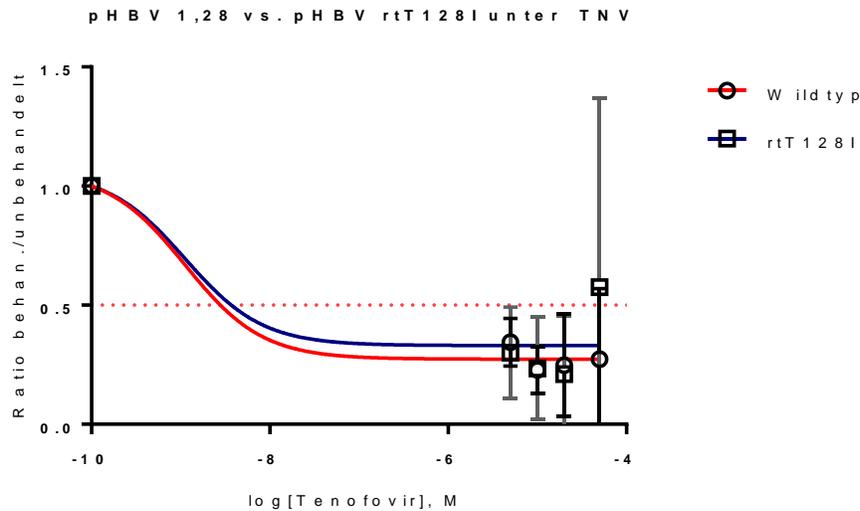


Abbildung 3.17: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der Resistenzmutation rtT128I (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von Tenofovir wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Die Symbole markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen Tenofovirkonzentrationen für Wildtyp (rund) und Mutante (quadratisch) mit Standardabweichung (Balken). Der Extra-Quadratsummen F-Test zur statistischen Überprüfung der IC_{50} -Werte konnte nicht berechnet werden.

3.4.4 Suszeptibilität für Tenofovir Disoproxil in mit pHBVrt T128N transfizierten HepG2-Zellen

Unter ADV-Behandlung konnte bei der Punktmutation rtT128N eine moderate Abnahme der Viruslast gegenüber dem Wt ermittelt werden, sodass sich hier die Frage stellte, ob eine Therapie mit TNV eine mögliche Alternative zu ADV darstellen könnte. Um das Verhalten auf eine Therapie mit TNV zu untersuchen, wurden daher mit dem HBV-Repikon pHBV rtT128N transient transfizierte HepG2-Zellen mit $0\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ oder $50\mu\text{M}$ TNV für sechs Tage behandelt. Aus den Mittelwerten der relativen Abnahme unter jeweiliger Dosierung, im Vergleich zur unbehandelten Probe, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, welche in Abbildung 3.18 dargestellt ist. Da der nach nichtlinearer Regressionsanalyse der errechnete IC_{50} -Wert von $0,003\mu\text{M}$ ebenfalls wie schon bei den Versuchen der Mutation rtT128I keinen plausiblen Wert ergab, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Aus dieser Anpassungskurve konnte ein IC_{50} -Wert von $0,31\mu\text{M}$ ($\log=-6,5054$) bestimmt werden, was dem 0,4-fachen Ansprechen im Vergleich zum Wt entspricht. Die IC_{50} -Werte aus den sigmoidalen Annäherungskurven der Mutante und des Wt wurden dann mit

einem Extra Quadratsummen F-Test überprüft. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Kurven ($p=0,5284$). Somit konnte in dieser phänotypischen Analyse gezeigt werden, dass sich die Punktmutation rtT128N nicht wesentlich vom Wt hinsichtlich seiner Suszeptibilität gegenüber TNV unterscheidet. Dadurch konnte in der phänotypischen Analyse gezeigt werden, dass TNV die Viruslast bei der Mutation rtT128N suffizient senkt.

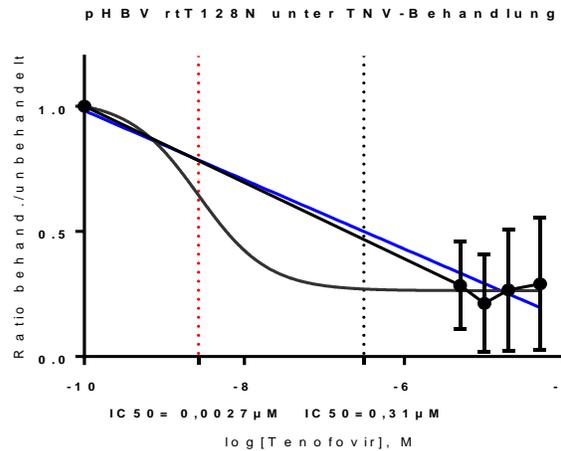


Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungs-Kurve aus den HepG2-Zellkulturversuchen mit der Resistenzmutation gegen ADV rtT128N unter Behandlung mit TNV. Die Messpunkte stellen die jeweiligen Durchschnittswerte mit der Standardabweichung (schwarzer Balken dar). Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (X-Achse). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. In einer nichtlinearen Regressionsanalyse wurde eine sigmoide Annäherungskurve berechnet (graue Kurve). Aus der Funktion dieser Kurve wurde der IC_{50} -Wert ermittelt, welcher bei Log -6,025 liegt, einer Konzentration von 0,003 μM (rote Linie X-Achse). Alternativ wurde eine lineare Regression durchgeführt, deren Gerade in Blau ist. Der IC_{50} -Wert aus dieser Funktion zeigte einen IC_{50} -Wert bei 0,7 μM (graue Linie X-Achse).

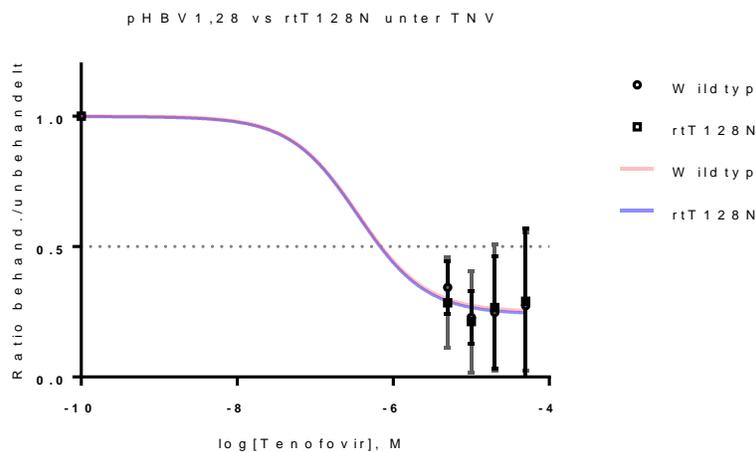


Abbildung 3.19: Vergleich der Annäherungskurven des Wildtyps (rote Kurve) und der Resistenzmutation rtT128N (blaue Kurve). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des Messwertes im Vergleich zur unbehandelten Probe aufgeführt. Die Konzentrationen von TNV wurden in zehnerlogarithmische Werte umgewandelt (x-Achse). Die Symbole markieren die jeweiligen Durchschnittswerte aller Messwerte bei den jeweiligen TNV-Konzentrationen für Wildtyp (rund) und Mutante rtT128N (quadratisch). Der Extra-Quadratsummen F-Test zur statistischen Überprüfung der IC_{50} -Werte ergab keinen Unterschied der beiden IC_{50} -Werte ($p=0,53$; 95%CI: unbekannt - log-5,822).

3.5 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen sollte gezeigt werden, ob sich der in genotypischen Untersuchungen gezeigte Zusammenhang einer Therapieresistenz von den Punktmutationen rtT128I und rtT128N sowie der Doppelmutation rtN248H/E263D auf ADV in phänotypischen Untersuchungen an Zellkulturversuchen bestätigen ließ. Zunächst wurden hierfür HBV-Replikons mit den Punktmutationen rtT128I und rtT128N durch *site directed mutagenesis* und einem anschließenden Kassettenaustausch hergestellt. Anschließend wurde durch Sequenzierungsanalysen die erfolgreiche Insertion der Mutation bestätigt. Die phänotypische Resistenzanalyse erfolgte in Zellkulturexperimenten mit Wildtyp- (pHBV 1,28) oder mutierten (pHBV rtT128I, pHBV rtT128N, pHBV rtN248H/E263D), die transient in HepG2 Zellen transfiziert, und für sechs Tage in aufsteigenden Konzentrationen mit ADV behandelt wurden. Nach Extraktion der viralen DNA wurde die Viruslast mittels HBV-spezifischer qPCR bestimmt. Aus den Messwerten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven gebildet und daraus der IC₅₀-Wert ermittelt. Die IC₅₀-Werte der Mutanten (rtT128I, rtT128N, rtN248H/E263D) wurden dann in Relation mit dem IC₅₀-Wert des Wildtyps (pHBV 1,28) gesetzt, um somit die Effektivität des Therapieansprechens darzustellen. Mittels Extra Quadratsummen F-Test wurde dann statistisch überprüft, ob sich die IC₅₀-Werte dieser Versuche signifikant voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse der Resistenzanalyse für ADV sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Bei der Punktmutation rtT128I konnte ein im Vergleich zum Wildtyp 3,6-fach vermindertes Ansprechen auf ADV gezeigt werden. Im Vergleich zur bekannten Resistenzmutation rtN236T, bei der ein 8,9-fach vermindertes Ansprechen gezeigt werden konnte, zeigte sich bei der Punktmutation T128I ein moderat vermindertes Ansprechen mit einem signifikanten Unterschied der IC₅₀-Werte im Vergleich zum Wildtyp. Ähnlich dazu zeigte die Punktmutation rtT128N eine 3-fach verminderte Suszeptibilität auf ADV mit einem signifikanten Unterschied der IC₅₀-Werte im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Doppelmutation N248H/E263D zeigte sich ein 2,4-fach vermindertes Ansprechen gegenüber dem Wildtyp auf ADV. Dies weist auf ein geringgradig vermindertes Ansprechen der

Doppelmutation auf ADV hin, die nach statistischer Testung sich jedoch nicht als signifikant erwies. Hiermit konnte eine mögliche Rolle der Punktmutation rtE263D als kompensatorische Mutation für die vormals beschriebene mögliche Resistenzmutation rtN248H nicht bestätigt werden. Aus den Ergebnissen dieser Experimente muss das häufige gemeinsame Auftreten der Doppelmutation rtN248H/E263D in der Kohorte der Vorarbeit (Walker, 2009) nach phänotypischer Analyse eher als koinzidentuell gewertet werden. Weiterhin konnte die nach genotypischer Analyse gefundene Assoziation der Mutationen rtT128I und rtT128N mit einer Therapieresistenz gegen ADV in den phänotypischen Analysen mit einer statistisch signifikanten, moderaten Resistenz in Zusammenhang gebracht werden.

In einer zweiten phänotypischen Untersuchung wurde die Suszeptibilität auf eine TNV-Behandlung untersucht, um eine mögliche antivirale Therapieoption für die Resistenzmutationen rtT128I und rtT128N zu eruieren. Hierzu wurden in Zellkulturexperimenten mit den HBV Replikons pHBV 1,28, pHBV rtT128I und pHBV rtT128N transfizierte HepG2-Zellen für sechs Tage mit TNV in aufsteigenden Konzentrationen behandelt, anschließend die virale DNA isoliert, und die Viruslast mit einer HBV-spezifischen qPCR bestimmt. Aus den daraus ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die IC_{50} -Werte der Mutanten rtT128I und T128N ermittelt und in Relation mit dem des Wildtyps gesetzt. Zusätzlich wurde mit statistischen Testungen ermittelt, ob sich die IC_{50} -Werte der Mutanten signifikant von derjenigen des Wildtyps unterscheiden. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit TNV sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Bei der Punktmutation rtT128I zeigte sich ein im Vergleich zum Wildtyp ähnliches Ansprechen ($0,7 \mu\text{M}$ vs $0,6\mu\text{M}$) auf TNV. Bei der Punktmutation rtT128N zeigte sich ein doppelt so gutes Ansprechen auf TNV, wie bei dem Wildtyp ($0,3\mu\text{M}$ vs $0,6\mu\text{M}$), welche jedoch nach statistischer Testung nicht signifikant war. Somit konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Resistenzmutationen für ADV rtT128I und rtT128N auf eine Behandlung mit TNV sehr gut ansprechen und TNV-Behandlung eine Alternative für ADV darstellen könnte.

HBV-Replikon	IC₅₀-Wert ADV	x-fache Resistenz (IC₅₀ Mutante/IC₅₀ WT)	IC₅₀-Vergleich p-Wert (95%- Konfidenzintervall)
Wildtyp pHBV (Genotyp D)	1,4 µM	1-fach	-
pHBV N236T (Genotyp D)	12,5 µM	8,9-fach	p<0,001 (log-5,14 – log-4,65)
pHBV T128I (Genotyp D)	5,1 µM	3,6-fach	p=0,0025 (log-5,86 – log-5,48)
pHBV T128N (Genotyp D)	4,2 µM	3-fach	p=0,0062 (log-5,85 – log-5,49)
rtN248H/rtE263D (Genotyp D)	3,3 µM	2,4-fach	p=0,0623 (log-5,95 – log-5,54)

Tabelle 3.1: Vergleich der IC₅₀-Werte der HBV-Mutanten mit dem HBV-Wildtyp aus den phänotypischen Untersuchungen mit Adefovir Dipivoxil. Der IC₅₀-Wert ist in Mikromolar (µM) angegeben; In der letzten Spalte sind die p-Werte und 95%-Konfidenzintervalle des Extra-Quadratsummen-F-Test der IC₅₀-Werte angegeben.

HBV-Replikon	IC₅₀-Wert TNV	x-fache Resistenz (IC₅₀ Mutante/IC₅₀ WT)	IC₅₀-Vergleich p-Wert (95%- Konfidenzintervall)
Wildtyp pHBV 1,28 (Genotyp D)	0,6 µM	1-fach	-
pHBV N236T (Genotyp D)	8,1 µM	13,5-fach	p= 0,0887 (unbekannt - log-5,43).
pHBV T128I (Genotyp D)	0,006 µM (0,7µM)	0,01-fach	-
pHBV T128N (Genotyp D)	0,003 µM (0,3µM)	0,005-fach	p=0,53 (unbekannt- log-5,822)

Tabelle 3.2: Vergleich der IC₅₀-Werte der HBV- Mutanten mit dem HBV-Wildtyp aus den phänotypischen Untersuchungen mit Tenofovir Dipivoxil. Der IC₅₀-Wert ist in Mikromolar (µM) angegeben; bei den Mutationen T128I/N sind in Klammern die IC₅₀-Werte aus eine linearen Regressionsanalyse dargestellt. In der letzten Spalte sind die p-Werte und 95%-Konfidenzintervalle des Extra-Quadratsummen-F-Test der IC₅₀-Werte angegeben.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung potenzieller Resistenzmutationen auf Adefovir Dipivoxil

Die chronische Hepatitis B (CHB) ist trotz therapeutischer Erfolge in der antiviralen Therapie mit jährlich ca. 900000 Menschen, die an den Folgen der einer HBV-Infektion versterben, eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. 2015 lebten 257 Millionen Menschen mit einer chronischen HBV-Infektion. Die WHO hat deswegen einen Aktionsplan initiiert, bis 2030 die virale Hepatitis als globale Bedrohung der öffentlichen Gesundheit einzudämmen (WHO, 2017). Derzeit ist es durch eine antivirale Therapie nicht möglich, bei CHB-Patienten das Virus komplett zu eliminieren und dadurch eine komplette Remission zu erzielen, aufgrund der Persistenz der viralen cccDNA in den Hepatozyten (Werle-Lapostolle *et al.*, 2004). Zur Therapie der CHB kommen Interferon α (IFN α), meist in pegylierter Form und die Nukleosid-/Nukleotidanaloga (NUC) Lamivudin (LAM), Telbivudin, Adefovir (ADV), Tenofovir (TNV) und Entecavir (ETV) zum Einsatz. Die Therapie mit Peg IFN α zeigt gute HBeAg-Serokonversionsraten und hat zum Vorteil, dass diese Therapie von begrenzter Dauer ist. Unter dieser Therapie besteht auch die Möglichkeit einer anhaltenden Response nach Therapieende (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012). Die Nachteile einer Therapie mit Peg IFN α ist die subkutane Applikation und das starke Nebenwirkungsprofil, weswegen dem Monitoring der Adhärenz eine besondere Bedeutung zukommt. NUC zeichnen sich durch eine bessere Verträglichkeit aus. Ihr wesentlicher Nachteil ist die Notwendigkeit einer meist unbegrenzten Dauer der Therapie und die Ausbildung von Therapieresistenzen.

Resistenzentwicklungen stellen bei der Therapie der CHB mit NUC eine große Herausforderung dar. Patienten mit verminderten Ansprechen auf die Therapie haben ein erhöhtes Risiko im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Leberzirrhose sowie ein hepatocelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln (Liaw *et al.*, 2004).

Die Identifikation von Resistenzmutationen dient dem Kliniker als wichtige

Entscheidungshilfe bei der Wahl einer effektiven antiviralen Therapie. Molekularepidemiologische Analysen erlauben es, Assoziationen bestimmter Mutationen im HBV-Genom mit einer Resistenzentwicklung in Zusammenhang zu bringen. Der direkte Zusammenhang einer vorgefundenen möglichen Resistenzmutation kann in phänotypischen Analysen erhärtet werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen in der reverse Transkriptase-Region (RT-Region) des HBV Genoms (rtT128I, rtT128N, rtN248H/rtE263D) wurden in Vorarbeiten in genotypischen Analysen mit einer antiviralen Resistenz gegenüber ADV in Zusammenhang gebracht (Walker, 2009). Die Sequenzanalysen wurden an einer Patientenkohorte von 276 Patienten mit Therapieversagen unter ADV-Therapie von 2003-2008 durchgeführt. Nach Einführung von TNV (2008) und ETV (2006), welche sich durch eine höhere antivirale Potenz und einer geringeren Rate von Resistenzentwicklungen auszeichnen, haben die führenden Fachgesellschaften ihre Therapieempfehlungen dahingehend geändert, dass TNV oder ETV als Erstlinientherapie für die CHB eingesetzt werden sollen ((EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012)(Terrault *et al.*, 2015)). Die Therapie mit ADV hat seit diesem Zeitpunkt nur eine nachrangige Bedeutung. Weiterhin ist ADV in breiter Anwendung in Ländern mit beschränkten Ressourcen und Zugang zu TNV und ETV. Diese vorwiegend in Afrika, Asien und Südamerika liegenden Länder zeigen eine endemische Verbreitung der HBV-Infektion. Demzufolge sind die hier aufgeführten Untersuchungen nach wie vor von hoher klinischer Relevanz.

Die untersuchte Patientenkohorte der Vorarbeit zeigte eine mittlere Behandlungsdauer von 18 ± 13 Monate mit ADV. Eine unzureichende Senkung der Transaminasen (biochemische Response) bestand bei 81 % und eine unzureichende Senkung der viralen Last $<0,6$ log-Stufen (virologische Response) bei 95% der Patienten. Der HBV Genotyps A (25%) und Genotyp D (56%), waren die am häufigsten detektierten Genotypen in Übereinstimmung mit Arbeiten von Deterding *et al.*(Deterding *et al.*, 2008) Der hohe Anteil des Genotyps D wurde auf den Migrationshintergrund der untersuchten Patienten zurückgeführt. Ein

Einfluss des HBV-Genotyps auf das Auftreten bestimmter Mutationsprofile konnte in den Vorarbeiten nicht gesehen werden in Übereinstimmung mit der Literatur (Sunbul, 2014). Der Anteil der HBeAg positiven Patienten betrug 67%, was eine untypische Verteilung darstellt, da sich die Prävalenzraten HBeAg negativer CHB Infektionen bis heute stetig erhöht haben. (Zarski *et al.*, 2006) (Fischer *et al.*, 2012). Ein Einfluss einer HBeAg-Negativität auf das Auftreten bestimmter Mutationen in der RT-Region wurde nicht beschrieben. Eine Vorbehandlung mit IFN α erhielten 96% (55/276). Ein Einfluss der IFN- α -Therapie auf das Auftreten bestimmter Mutationen in der RT-Region ist nicht beschrieben. Eine initiale antivirale Resistenz gegenüber LAM bestand bei 39% (109/276). Im Verlauf der ADV-Therapie sank der Anteil der Patienten mit LAM-Resistenz auf 21%, was in Zusammenhang mit dem Durchsetzen von Wildtypstämmen und Quasispezies mit Resistenzen gegenüber ADV gebracht wurde und sich mit Daten aus der Literatur deckt (Villeneuve *et al.*, 2003). Es konnte weiterhin kein Zusammenhang gesehen werden mit einem vermehrten Auftreten von ADV-Resistenzen nach Vorbehandlung mit LAM und Umstellung auf ADV Monotherapie (Y. S. Lee *et al.*, 2006), oder einer Verringerung dieser Resistenzentwicklung durch eine „*add-on*“-Therapie mit ADV unter bestehender LAM-Behandlung (Lampertico *et al.*, 2007), da in dieser Kohorte keine Informationen vorlagen über eine Kombinations- oder sequenzielle Therapie mit LAM und ADV. Um eine potenzielle Assoziation von vermuteten Resistenzmutationen mit einer Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurden die HBV-Polymerasesequenzen der HBV-Isolate mit den Wildtypsequenzen aus Genbanken verglichen. Neu aufgetretene Mutationen wurden mit einem verminderten virologischen und biochemischen Ansprechen verglichen und eine statistische Assoziation durch den Fisher-Exact-Test bestimmt. Ein vermindertes virologisches Ansprechen wurde als Anstieg der viralen Kopienzahl > 1 Logstufe pro ml im Vergleich zum Therapiebeginn mit ADV definiert. Ein vermindertes biochemisches Ansprechen wurde als Anstieg der Aminoalanintransferase (ALT) über das zweifache des Normalwertes (35 IU/ml) definiert. Nach statistischer Auswertung zeigte sich für die Mutationen rtA38E/T ($p=0,008$), rtT128N/I

($p=0,035$) und $rtL231V$ ($p=0,015$) eine Korrelation mit einem virologischen Therapieversagen. Die bekannte ADV-Resistenzmutation $rtN236T$ wurde bei 8% der Patienten detektiert und hierfür auch eine Korrelation mit einem verminderten virologischen Ansprechen ermittelt ($p=0,029$). Die andere häufig vorkommende Resistenzmutation gegenüber $rtA181V$ konnte bei 13% der Patienten nachgewiesen werden. Ein statistischer Zusammenhang mit einem verminderten virologischen Ansprechen für $rtA181V$ konnte nicht gezeigt werden. Eine moderate Assoziation mit einem verminderten biochemischen, jedoch keinem verminderten virologischen Ansprechen konnte für die Mutation $rtN248H$ festgestellt werden. Die Mutation $rtN248H$ trat bei 37% der Patienten auf und war häufig mit der Mutation $rtE263D$ vergesellschaftet. In phänotypischen Untersuchungen mit HBV-Replikons mit der Punktmutation $rtN248H$, die in Huh-7-Zellkulturen transfiziert und mit ADV behandelt wurden, konnte ein im Vergleich mit dem HBV-Wildtypreplikon transfizierten Zellen ein 4-fach vermindertes Ansprechen auf ADV nachgewiesen werden. Somit konnte hier sowohl ein genotypischer, wie auch phänotypischer Zusammenhang mit einer ADV-Resistenz nachgewiesen werden.

4.2 $rtE263D$ zeigt keinen zusätzlichen Effekt auf die verminderte Sensitivität von $rtN248H$ auf Adefovir Disiproxil

Aufgrund der häufigen Assoziation der Mutation $rtN248H$ mit der Mutation $rtE263D$ wurde vermutet, dass es sich bei $rtE263D$ um eine kompensatorische Mutation handelt, die die virale Fitness der Quasispezies mit der Doppelmutation $rtN248H/rtE263D$ gegenüber anderen erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde in Zellkulturversuchen untersucht, ob sich tatsächlich ein Einfluss der Mutation $rtE263D$ auf eine Erhöhung der Resistenz gegenüber ADV beobachten lässt. In Versuchen mit dem HBV-Replikon $rtN248H/E263D$ transfizierten Zellen konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Die Suszeptibilität gegenüber ADV war in diesen Versuchen um das 2,4-fache gegenüber dem Wildtyp vermindert. Der IC_{50} -Wert war statistisch nicht signifikant vermindert, im Vergleich zum Wildtyp (Kap3.5, Tab.3.1). Somit zeigte sich ein schwächerer Resistenzeffekt im

Vergleich zu Vorarbeiten, in der eine 4-fach verminderte Suszeptibilität nachgewiesen wurde (Walker, 2009). Insgesamt konnten jedoch die Ergebnisse der Vorarbeiten bestätigt werden, die nach Recherche der Literatur erstmalig einen geno- und phänotypischen Zusammenhang mit einem verminderten Ansprechen der Polymerasemutation rtN248H auf ADV beschrieben hatten. Die Deutung der Mutation rtN248H als mögliche Resistenzmutation steht jedoch im Widerspruch zu Daten von Yang et al. von 2002 aus einer Observationsstudie für Resistenzmutationen. In dieser Studie wurden 39 Patienten mit CHB in einer Phase II Studie 48 bis 60 Wochen mit ADV behandelt und Sequenzierungen der HBV-Polymerase aus deren Seren auf neu aufgetretene Mutationen untersucht. Hierbei konnte nur bei einem Patienten die Mutation rtN248H nachgewiesen werden. Dieser zeigte keine Therapieresistenz auf eine ADV-Therapie. Ein im Vorfeld erfolgter Abgleich von 70 HBV-Wildtyp-Sequenzen aus einer Gendatenbank zur Identifizierung möglicher Polymorphismen zeigte, dass es sich bei dem Aminosäureaustausch rtN248H wahrscheinlich um einen Polymorphismus handelt. Aus diesem Grund wurde eine weitere *In-vitro*-Testung auf eine Resistenz nicht durchgeführt (Yang et al., 2002). In einer anderen Studie von Borroto-Esoda et al. wurde eine gepoolte Analyse von Aminosäureaustauschen in der HBV-Polymerase bei CHB Patienten aus vier großen klinischen Studien mit ADV durchgeführt. Hier wurden die HBV-Polymerase Sequenzen von 172 Patienten untersucht, die für 48 Wochen ADV erhalten und eine entweder nicht ausreichende Senkung, oder einen Wiederanstieg der viralen Last unter Therapie erfahren hatten. Die Auswertung zeigte Aminosäureaustausche in mindestens einer Patientensequenz an 97 von 344 Stellen der HBV-Polymerase. Diese Aminosäureaustausche inklusive derer, die als Polymorphismus gewertet wurden, wurden statistisch auf einen Zusammenhang mit einer Therapieresistenz untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass lediglich die bereits bekannten, in hochkonservierten Regionen befindlichen Resistenzmutationen rtN236T und rtA181V signifikant mit einer Resistenzentwicklung gegenüber ADV assoziiert waren. Interessanterweise konnte hier für die im Vorfeld in anderen Untersuchungen beschriebenen

möglichen Resistenzmutationen rtV84M, rtS85D, rtV214A, rtQ215S, rtI233V, rtP237H und rtN238T/D kein statistischer Zusammenhang mit einer Resistenzentwicklung nachgewiesen werden. Weder die Mutationen rtN248H noch rtE263D wurden in dieser Studie detektiert (Borroto-Esoda, Miller and Arterburn, 2007). Eine mögliche Erklärung, warum die Mutationen rtN248H und rtE263D nicht in der Untersuchung von Borroto-Esoda gefunden wurden, könnte eine andere Verteilung der HBV Genotypen in der Patientenkohorte, verglichen zu der aus der Analyse der Vorarbeit sein, in der diese Mutationen sehr häufig detektiert wurden. Eine andere mögliche Erklärung könnte ein Selektionsbias sein, der durch die Einschlusskriterien der klinischen Studien verursacht wurde und dazu geführt hat, dass sich die Populationen von Walker und Borrota-Esoda bezüglich biometrischer Parameter wesentlich voneinander unterscheiden. Auf einen möglichen unterstützenden Effekt von rtN248H auf die Entecavir-Resistenzmutation rtM250V wurde durch Strukturmodellanalysen durch Michailidis et al. hingewiesen (Michailidis *et al.*, 2012).

Der Nachweis eines zusätzlichen Einflusses der Polymerasemutation rtE263D auf die verminderte Sensitivität der Mutation rtN248H auf ADV konnte in vorliegender Arbeit nicht gezeigt werden. Als mögliche Ursache für das vermehrt häufige Auftreten von rtE263D in Kombination mit rtN248H (Siehe Kapitel 3.1) wurde eine Rolle als mögliche kompensatorische Mutation von rtE263D vermutet. Als kompensatorische Mutationen werden solche gewertet, die die replikative Fitness der entsprechenden Quasispezies erhöhen, oder die Sensitivität der eingesetzten antiviralen Therapie weiter abschwächen. Entsprechend einer Publikation von Zoulim und Locarnini gehen Mutationen, die mit einer Resistenz gegenüber einem NUC assoziiert sind, mit einer Einbuße der replikativen Kompetenz der Quasispezies im Vergleich zum Wildtyp einher. Die kompensatorischen Mutationen verbessern die replikative Fitness der Quasispezies, sodass sie sich besser gegenüber anderen Quasispezies und dem Wildtyp durchsetzen kann (Zoulim and Locarnini, 2009)(Villet *et al.*, 2009). Eine Untersuchung der replikativen Kompetenz wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hier könnte in weiteren *In-vitro*-Versuchen untersucht werden, ob

das Hinzufügen der Mutation rtE263D zur Mutation rtN248H die replikative Kompetenz verbessert.

4.3 Die Mutationen rtT128I und rtT128N zeigen gegenüber Adefovir Disiproxil eine verminderte Sensitivität

In genotypischen Analysen der Vorarbeit wurden die Mutationen rtT128I und rtT128N bei 3% der Patienten detektiert (Walker, 2009). In der statistischen Testung dieser Mutationen konnte ein signifikanter Zusammenhang mit einer virologischen Therapieresistenz gegen ADV nachgewiesen werden (Kap. 3.1).

In der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten konnte kongruent dazu eine verminderte Suszeptibilität für ADV mit einer IC_{50} für rtT128I und rtT128N von 5,1 μ M, beziehungsweise 4,2 μ M gezeigt werden. Im Vergleich zum IC_{50} -Wert des Wildtyps waren die IC_{50} -Werte von rtT128I und T128N statistisch signifikant unterschiedlich und zeigten im Vergleich zum Replikon der bekannten Resistenzmutation rtN236T eine moderat verminderte Sensitivität gegenüber ADV (Kap. 3.4). Somit konnte der Verdacht einer möglichen Therapieresistenz dieser Mutationen aus den genotypischen Analysen auch durch die Zellkulturversuche phänotypisch bestätigt werden. In der Literatur wurde der Aminosäureaustausch rtT128N bisher im Zusammenhang mit seiner Veränderung, die er im S-Gen verursacht, untersucht. Durch die kompakte Organisation des HBV-Genoms überlappt der offene Leserahmen für das S-Gen vollständig mit dem der Polymerase. Dadurch können Mutationen unter antiviraler Therapie entstehen, die die Funktion der HBV-Polymerase, aber auch der S-Proteine beeinflussen (Siehe Kapitel 1.2.2) (Sheldon and Soriano, 2008). Der Aminosäureaustausch rtT128N führt im S-Gen zu dem Aminosäureaustausch sP120T. Diese Mutation gehört mit der Mutation sG145R zu den am häufigsten vorkommenden *Immune-Escape*-Mutationen. *Immune-Escape*-Mutationen führen durch Veränderungen in der a-Determinante des S-Proteins (Kap. 1.5.3) dazu, dass die anti-HBs-AK nicht mehr an ihre Epitope binden können und dadurch die humorale Immunantwort abgeschwächt wird. Die Mutation sP120T wird häufig bei Patienten beobachtet, die nach einer

Lebertransplantation eine anti-HBs-Immunglobulintherapie erhalten haben. In Arbeiten von Bock und Torresi konnte für die Mutation rtT128N beziehungsweise sP120T nachgewiesen werden, dass sie für die Resistenzmutation für LAM eine wichtige Rolle als kompensatorische Mutation erfüllt. Es konnte in Zellkulturversuchen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden, dass die Mutation rtT128N eine ähnliche Replikationskompetenz und eine ähnliche Sensitivität auf LAM besitzt. Im Gegensatz dazu zeigte die bekannte Resistenzmutation gegenüber LAM rtL180M/M204V/I eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Replikationskompetenz und verminderte Sensitivität. In Konstrukten, in denen die LAM-Resistenz rtL180M/M204V/I mit der Mutation rtT128N kombiniert wurde, zeigte sich unter einer LAM-Therapie eine vergleichbare Menge an replizierter viraler DNA im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutation rtT128N erhöht also unter einer Therapie mit LAM die replikative Kompetenz von Quasispezies, die die Resistenzmutation rtL180M/M204V/I beinhalten (Bock *et al.*, 2002)(Torresi *et al.*, 2002). Amini-Bavil-Olyaei *et al.* konnten in weiteren Untersuchungen der Replikationskompetenz von Konstrukten mit der Kombination rtT128N (sP120T) und rtM204I oder rtL180M/rtM204V im Vergleich zur Mutation rtL180M/rtM204V alleine, keinen zusätzlichen Effekt auf die Replikationskompetenz der Mutation rtT128N unter LAM-Therapie nachweisen. Im Vergleich zum Wildtyp waren unter LAM-Behandlung alle Konstrukte mit den Mutationen rtM204I oder rtL180M/M204V replikationskompetenter. Um einen möglichen Effekt einer Alternativbehandlung mit dem Nucleotidanalogen ADV zu untersuchen, wurden Konstrukte mit den Resistenzmutationen gegenüber LAM und der Mutation sP120T oder einer anderen *Escape*-Mutation sG145R in Zellkulturversuchen mit 15 µM ADV behandelt. Hier zeigte sich bei der Mutation sP120T (rtT128N) im Vergleich zum Wildtyp und der Mutation sG145R eine leicht verminderte Sensitivität gegenüber ADV (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2010). Die Versuche von Amini-Bavil-Olyaei bestätigen somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, obwohl nicht auszuschließen ist, dass die verminderte Sensitivität gegenüber ADV nicht durch die Kombination von sP120T (rtT128N) mit den LAM-Resistenzmutationen bedingt wurde.

Die Mutation rtT128I wurde in Studien von Villet ebenfalls im Kontext ihrer Bedeutung als S-Gen-Mutation sP120S beschrieben. In der Arbeit von Villet wurde bei einem CHB Patienten mit Leberzirrhose, der anschließend eine Lebertransplantation erhielt, die Veränderung der Zusammensetzung der dominierenden HBV Quasispezies im Serum unter antiviraler Therapie untersucht. Nachdem eine langjährige Monotherapie mit LAM zu einem Wiederanstieg der Viruslast geführt hatte, wurde die LAM um ADV ergänzt, was zu einer erfolgreichen Senkung der Viruslast führte. Schließlich musste dem Patienten eine neue Leber transplantiert werden. Im Rahmen dessen erhielt dieser Patient zeitweise eine Therapie mit anti-HBs-AG Immunglobulinen. Im weiteren Verlauf unter LAM und ADV kam es nochmals zu einem Wiederanstieg der viralen Last, sodass man sich entschied auf eine auf eine Monotherapie mit TNV umzustellen, worunter sich die Viruslast wieder suffizient senken ließ. Aus Seren, die über den gesamten Verlauf dieser Therapie gewonnen wurden, konnte durch Sequenzanalysen die Zusammensetzung der dominierenden Quasispezies in der HBV-Population zu bestimmten Zeitpunkten der Therapie bestimmt werden. Hierbei zeigte sich dass vor allem unter anti-HBs Immunglobulintherapie die Mutation rtT128I einen Selektionsvorteil hatte und sich in der Population durchsetzen konnte und dadurch möglicherweise zu dem Therapieversagen gegenüber ADV und LAM beigetragen haben könnte (Villet *et al.*, 2009).

4.4 Adefovir Disiproxil hat eine Resistenz bei rtN236T *in vitro*

Für die HBV-Polymerasemutation rtN236T konnte sowohl in genotypischen wie auch in phänotypischen Analysen gezeigt werden, dass sie verantwortlich ist für Therapieresistenzen gegenüber ADV. In genotypischen Studien konnte Borrodo-Esoda zeigen, dass bei CHB Patienten unter langjähriger ADV-Therapie die Mutationen rtN236T und rtA181V signifikant mit einem Therapieversagen assoziiert sind (Borroto-Esoda, Miller and Arterburn, 2007). Die Mutation rtN236T konnte ebenfalls in den Untersuchungen von Walker bei 23 % der Patienten nachgewiesen werden und war signifikant mit einem virologischen

Therapieversagen assoziiert (Walker Dissertation 2009). In Zellkulturversuchen konnte bei Konstrukten mit der Mutation rtN236T eine im Vergleich zum Wildtyp eine 3-7-fach verminderte Suszeptibilität für ADV nachgewiesen werden (Qi *et al.*, 2007) (Brunelle *et al.*, 2005). Walker zeigte in ihren Zellkulturversuchen eine >6,7-fach verminderte Resistenz gegenüber Adefovir. In der vorliegenden Arbeit konnte die stark verminderte Suszeptibilität der Mutation rtN236T gegenüber ADV bestätigt werden. Es zeigte sich eine 9-fach verminderte Suszeptibilität gegenüber ADV.

4.5 Tenofovir Disoproxil zeigt eine verminderte Effektivität bei rtN236T *in vitro*

Für die Mutationen rtN236T, rtT128I und rtT128N konnte in der vorliegenden Arbeit die in der Vorarbeit gezeigte genotypische Assoziation mit einer Therapieresistenz bestätigt werden. Es stellte sich die Frage, ob eine Behandlung mit TNV eine ausreichende Suszeptibilität auf eine antivirale Therapie wiederhergestellt werden kann. TNV zeichnet sich durch eine höhere antivirale Potenz und geringere Resistenzentwicklung als ADV, bei ähnlichem Nebenwirkungsprofil aus. TNV wird in den aktuellen Empfehlungen der Fachgesellschaften zusammen mit ETV als Mittel der ersten Wahl für die Behandlung der CHB mit NUC vorgeschlagen (EASL and European Association for the Study of the Liver, 2012). Klinische Daten weisen auf eine gute Wirksamkeit von TNV hin bei Patienten, die ein Therapieversagen unter ADV entwickelt haben. Lim *et al.* konnten in einer Studie an Patienten mit Therapieversagen unter ADV und nachgewiesener Resistenzmutation rtN236T oder rtA181T/V zeigen, dass nach einer TNV-Therapie für 144 Wochen sich die Viruslast suffizient senken ließ (Lim *et al.*, 2017). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Svarovskaja *et al.* in einer Untersuchung bei 105 Patienten mit virologischem Therapieversagen unter ADV-Therapie, wobei bei 14% der Patienten rtN236T in Sequenzanalysen detektiert werden konnte. Statistisch zeigte sich bei diesen Mutationen kein Unterschied hinsichtlich der Senkung der Viruslast im Vergleich zum Wildtyp. Auch bei den Resistenzen, die zusätzlich zu

rtN236T die andere ADV-Resistenzmutation rtA181V/T trugen, konnte kein Unterschied in der Suszeptibilität auf ADV festgestellt werden (Svarovskaia *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu stehen Daten von van Bömmel, der bei CHB Patienten mit Therapieversagen unter ADV-Therapie nachweisen konnte, dass bei nachgewiesener ADV-Resistenz eine verminderte Sensitivität auf TNV auftritt (Van Bömmel *et al.*, 2010). Zusammenfassend weisen die Untersuchungen aus der Literatur jedoch eher darauf hin, dass TNV auch bei Patienten mit vorbestehender ADV-Mutation rtN236T eine effektive Senkung der Viruslast bewirkt. Die Veröffentlichungen zu *In-vitro*-Untersuchungen der Suszeptibilität von rtN236T für TNV sind dagegen eher uneindeutig. Qi *et al.* untersuchte an stabilen, HBV replizierenden Zelllinien die Mutation rtN236T und ihre Sensitivität auf ADV und TNV und konnte ein 7- beziehungsweise 4-fach vermindertes Ansprechen der NUC im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Das auch unter TNV gezeigte verminderte Ansprechen wurde in dieser Arbeit als ausreichend effektive Antwort auf die TNV-Behandlung betrachtet (Qi *et al.*, 2007). Delaney *et al.* konnten in *In-vitro*-Versuchen ebenfalls eine 3-4-fach verminderte Suszeptibilität auf TNV nachweisen (Delaney *et al.*, 2006). In einer Arbeit von Murakami *et al.* wurde *in vitro* untersucht, ob es einen Unterschied der Sensitivität auf TNV in Abhängigkeit des Genotyps gibt. Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass nach Abhängigkeit des Genotyps eine unterschiedliche Sensitivität auf die Mutation rtN236T besteht. So zeigten Zellkulturen, die mit Konstrukten mit dem Genotyp C transfiziert wurden, eine 4-fache und Konstrukte transfiziert mit Genotyp A eine 5-fach verminderte Sensitivität auf TNV (Murakami *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu diesen Studien steht die Arbeit von Liu *et al.*, in der rtN236T in HBV-Replikons mit unterschiedlichen Genotypen eingefügt und deren Sensitivität auf TNV in Zellkulturassays bestimmt wurde. Hier waren die mit rtN236T transfizierten Zellen unabhängig vom Genotyp ähnlich sensitiv auf TNV wie der Wildtyp. Interessanterweise war die Suszeptibilität für TNV beim Genotyp D sogar ausgeprägter als beim Genotyp B oder C. (Liu, Miller and Kitrinis, 2014). Die in vorliegender Arbeit erbrachten Resultate zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp

stark verminderte Sensitivität auf TNV bei mit rtN236T transfizierten Zellen (Kap 3.5). Mit einem IC_{50} -Wert von 8,1 μ M wiesen sie eine 13,5-fach verminderte Sensitivität auf und somit einen im Vergleich zu den oben erwähnten Studien aussergewöhnlich stark verminderten Effekt. Beispielsweise war die IC_{50} in den Zellkulturassays mit rtN236T-Konstrukten bei 0,52 -2,6 μ M in der Studie von Murakami et al., während die IC_{50} -Werte für die Assays mit dem Wildtyp vergleichbar bei 0,25-0,51 μ M lagen (Murakami et al., 2016). Möglicherweise wurde der IC_{50} -Wert der Versuche mit rtN236T zu hoch berechnet, aufgrund der größeren Streuung der Messwerte im Vergleich zu denen beim Wildtyp. Insgesamt konnten in vorliegender Arbeit die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden, welche jedoch im Widerspruch zu den klinischen Daten liegen. Eine Ursache hierfür könnten Mutationen sein, die in den *In-vitro*-Versuchen nicht berücksichtigt wurden, jedoch für die virale Fitness der HBV-Spezies mit der Mutation rtN236T *in vivo* negativ beeinflussen. Als andere Ursache wurde von Liu et al., die in ihren *In-vitro*-Versuchen die *In-vivo*-Daten zu der Sensitivität von rtN236T auf TNV bestätigen konnten, methodische Ursachen bei den Studien, die eine verminderte Sensitivität aufgezeigt hatten, diskutiert (Liu, Miller and Kitrinis, 2014).

4.6 Tenofovir Disoproxil senkt die Viruslast in mit rtT128N- und rtT128I-Replikons transfizierten HEpG2-Zellen suffizient

In den Zellkulturexperimenten mit den transfizierten HBV-Replikons, die die Mutation rtT128I oder rtT128N beinhalteten, konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TNV die Viruslast stark senkte (Kap. 3.4.3/4). Somit konnte durch *In-vitro*-Versuche ein möglicher Behandlungsansatz für diese HBV-Spezies mit diesen Mutationen nachgewiesen werden, bei denen im Vorfeld eine Resistenz gegenüber ADV sowohl geno- als auch phänotypisch aufgezeigt werden konnte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Amini-Bavil-Olyaei, der mit rtT128N transfizierte Zellkulturen mit TNV behandelte. In seiner Arbeit wurden HBV-Replikons, die rtT128N und zusätzlich die Lamivudinresistenz rtM204I oder rtL180M/rtM204V beinhalteten mit 30 μ M TNV behandelt. Es konnte eine im

Vergleich zum Wildtyp vergleichbare signifikante Senkung der Viruslast erzielt werden. Allerdings ist die Aussagekraft aus diesen Versuchen limitiert, da ein möglicher Effekt der Lamivudinresistenzen auf die Suszeptibilität auf TNV nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin zeigen sich Hinweise, dass in der Arbeit von Amini-Bavil-Olyaei der Effekt von TNV auf die Senkung der Viruslast mit einer Senkung von 40-60% unter 30 μM TNV nicht so ausgeprägt war wie in vorliegender Arbeit, in der die IC_{50} -Werte für T128N bei 0,7 μM lag (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2010).

In den mit HBV-Replikons mit der Mutation rtT128I transfizierten HepG2-Zellkulturen, die mit TNV behandelt wurden, zeigte sich eine bei einem IC_{50} -Wert von 0,7 μM vergleichbare Suszeptibilität zum Wildtyp (Kap. 3.4.3). In der Literatur konnten keine vergleichbaren Daten gefunden werden. In der oben beschriebenen Arbeit von Villet zeigte sich in der Einzelfallbeschreibung, dass die Mutation rtT128I nach einer anti-HBs-Immunglobulinbehandlung in der gesamten Population des HBV-Genoms des Patienten durchsetzen konnte. Nachdem der Patient eine Therapieversagen unter Kombinationstherapie mit LAM und ADV hatte, bedingt durch die Ausbildung multipler Resistenzmutationen gegen diese Substanzen, konnte durch eine Umstellung auf eine TNV-Monotherapie eine suffiziente Senkung der Viruslast wiederhergestellt werden. Somit besteht ein eingeschränkter Hinweis darauf, dass TNV auch in Anwesenheit der Mutation rtT128I wirksam ist (Villet *et al.*, 2006).

4.7 Fazit und Ausblick

Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit bestätigen die Ergebnisse der genotypischen Analyse der Vorarbeit (Walker, 2009), in der ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Mutationen rtT128N und rtT128I mit einem verminderten virologischen Ansprechen auf ADV gezeigt werden konnte. Der molekulare Mechanismus dieser Resistenzentwicklung ist bisher unverstanden. Aus Strukturuntersuchungen der HBV-Polymerase geht hervor, dass die Resistenzmutationen gegen ADV rtN236T und rtA181V im Gegensatz zu der Lamivudinresistenz rtL204M/V außerhalb des katalytischen Zentrums in der

sogenannten D-, beziehungsweise B-Domäne der HBV-Polymerase liegen. Es wird vermutet, dass diese Domänen für die Bindung der dNTPs verantwortlich sind. Bei der HBV-Polymerase des Wildtyps geht rtN236 eine Wasserstoffbindung mit rtS85 ein. Diese Bindung scheint in eine direkte Wechselwirkung mit ADV zu treten. Durch den Aminosäureaustausch rtN236T wird die Wasserstoffbindung zu rtS85 unterbrochen, was die Bindungsaffinität zu ADV vermindert. Die Mutation rtA181V liegt dagegen in der B-Domäne. Als Mechanismus einer Resistenz gegenüber ADV wird eine allosterische Veränderung des katalytischen Zentrums in der C-Domäne vermutet (Ghany and Liang, 2007). Die Mutationen rtT128I und rtT128N liegen zwischen den Domänen A und B in der sogenannten A-B-Interdomäne. Die Bedeutung dieser Region für die Funktion der viralen Polymerase ist weitestgehend unbekannt. Bock et al. vermuteten, dass sich die Mutation rtT128N auf die Aktivität und replikativen Eigenschaften der Polymerase auswirken könnte (Bock *et al.*, 2002). Weitere Strukturanalysen könnten einen möglichen molekularen Mechanismus der Resistenzentwicklung von T128I und T128N aufdecken, um eine Bestätigung für den geno- und phänotypisch gezeigten Hinweis auf eine Resistenz zu erhalten. Ein weiterer unklarer Aspekt ist das Zusammenwirken von rtT128I und rtT128N in ihrer doppelten Funktion als Polymerasemutationen und im S-Gen als *Immune-escape*-Mutationen. Hier ist beispielsweise von anderen Mutationen wie beim Aminosäureaustausch rtA181T bekannt, dass er im S-Gen zu einem Stopp-Codon im S-Protein an der Aminosäureposition 172 und dadurch zu einer Trunkierung des S-Protein führt (Warner and Locarnini, 2008). Dadurch entsteht durch diese Mutation ein sekretorischer Defekt mit einer verminderten Freisetzung von Virionen. Als Folge dessen kann es zu einer falsch niedrigen Bestimmung der viralen Last beim Monitoring der antiviralen Therapie kommen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Akkumulation von trunkierten Anti-HBs-Antigenen die Entstehung von HCC begünstigt (Lazarevic, 2014). Für die Mutation rtT128N/sp120T konnte von Amini-Bavil-Omyaee ein negativer Effekt auf die Sekretion von HBs-Ag gezeigt werden (Amini-Bavil-Olyaae *et al.*, 2010). Somit könnte neben der verminderten Suszeptibilität auf

eine antivirale Therapie die zusätzliche Veränderung der S-Protein-Funktion einen negativen Effekt auf den Verlauf bei einer Infektion mit Mutanten mit rtT128N/I haben, wie zum Beispiel einem erhöhten Risiko der Entstehung eines HCC. Um diesen kombinierten Effekt besser zu verstehen bedarf es weiterer *In-vivo*- und *In-vitro*- Untersuchungen an Patienten, die diese Mutationen mit sich tragen.

In den Zellkulturversuchen konnte ein zusätzlicher Effekt auf die Verminderung der Suszeptibilität der Mutation rtN248H auf ADV nicht gezeigt werden. Möglicherweise besteht ein Einfluss von rtE263D auf die replikative Kompetenz von Plasmiden mit der Mutation rtN248H. Diese kann in weiterführenden Versuchen zur replikativen Kompetenz der Doppelmutation rtN248H/rtE263D näher betrachtet werden.

Die Behandlung der Mutationen rtT128I und rtT128N mit TNV zeigte eine suffiziente Senkung der viralen Last und könnte somit eine Behandlungsoption für Patienten mit diesen Mutationen und einem Therapieversagen unter ADV darstellen. Da mittlerweile in der klinischen Praxis TNV als Erstlinientherapie angewendet wird, bei der bis dato kaum ein Therapieversagen aufgetreten ist, können die in vorliegender Arbeit untersuchten Mutationen unter ADV-Therapie mittlerweile für Westeuropa und Nordamerika lediglich eine nachgestellte klinische Relevanz besitzen. In Regionen mit eingeschränktem Zugang auf TNV, ist die Berücksichtigung dieser Mutationen jedoch von großem Nutzen für die Optimierung der antiviralen Therapie von CHB-Patienten, auch unter dem Aspekt, dass in diesen Regionen (Subsahara-Afrika, Westpazifikstaaten) HBV-Infektionen endemisch sind (WHO, global hepatitis report).

5. Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis B Infektion (CHB) ist mit 257 Millionen infizierten Menschen eine der häufigsten Ursachen einer Hepatitis und führt trotz Einführung einer Vakzination und einer antiviralen Therapie häufig zu weiteren Komplikationen wie Leberzirrhose oder hepatozellulärem Karzinom. Eine Heilung der CHB ist aufgrund der Persistenz der viralen DNA in den Hepatozyten bisher nicht erreichbar. Die Therapie mit Nucleosid- und Nucleotidanaloga (NUC) führt zu einer effektiven Senkung der viralen Last mit einer Verbesserung der entzündlichen Aktivität bei den CHB-Patienten und verzögert dadurch das Fortschreiten der Infektion mit weiteren Komplikationen. Unter NUC-Therapie, vor allem mit Lamivudin und Adefovir Diprivoxil (ADV), kommt es aber im Verlauf häufig zu Resistenzentwicklungen, die mit einem erneuten Anstieg Viruslast und einer klinischen Verschlechterung einhergehen können. Als Ursache hierfür wurden in geno- sowie phänotypischen Analysen Mutationen im Genom der viralen Polymerase beschrieben. Die häufigsten unter ADV-Therapie vorkommenden Mutationen sind die Mutation rtN236T und rtA181V. In weiteren genotypischen Analysen aus Vorarbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit konnten aus den HBV-Genomen von 276 Patienten unter ADV-Therapie, die zwischen 2003-2008 ein Therapieversagen entwickelt hatten, weitere Mutationen identifiziert werden. Diese Mutationen gingen mit einem verminderten virologischen oder biochemischen Ansprechen auf ADV einher. Insbesondere zeigten die HBV-Polymerasemutationen rtT128I und rtT128N einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit einem verminderten virologischen Ansprechen. Desweiteren war die Mutation rtN248H statistisch signifikant mit einem verminderten biochemischen Ansprechen assoziiert und zeigte in phänotypischen Untersuchungen eine verminderte Suszeptibilität auf ADV. Aufgrund des vermehrten gemeinsamen Auftretens der Mutationen rt248H und rtE263D wurde vermutet, diese könne eine kompensatorische Mutation darstellen, die den Resistenzeffekt von rt248H verstärkt. In dieser Doktorarbeit wurden die Mutationen einer phänotypischen Resistenzanalyse in

Zusammenfassung

Zellkulturexperimenten unterzogen. Dafür wurden HepG2-Zellen mit HBV-Replikons, die den Wildyp (Wt), die Mutationen rtT128I, rt128N und die Doppelmutation rtN248H/rtE263D beinhalteten, transfiziert und für sechs Tage mittels Konzentrationskinetik mit ADV behandelt. Nach Zellernte und Isolation der viralen DNA wurde die Viruslast mittels quantitativer PCR bestimmt und die Dosis-Wirkungs-Kurve mit den IC₅₀-Werten kalkuliert. Die replikationskompetenten HBV-Replikons rtT128I und rtT128N wurden im Vorfeld durch *site directed mutagenesis* generiert. Die phänotypischen Resistenzanalysen zeigten für die Mutation rtT128I und rtT128N im Vergleich zum Wt eine statistisch signifikante 3,6-fach beziehungsweise 3,0-fach verminderte Sensitivität gegenüber ADV. Für die Doppelmutation rtN248/E263D zeigte sich eine statistisch nur moderat signifikante 2,4-fach verminderte Sensitivität gegenüber ADV, im Vergleich zum Wt. Um die Möglichkeit der Mutationen rtN236T, rtT128I und rtT128N auf eine Therapierbarkeit mit Tenofovir Disoproxil (TNV) zu untersuchen, wurden in weiteren Versuchen phänotypische Resistenzanalysen mit TNV durchgeführt. Hier zeigte sich, dass TNV die Viruslast bei rtT128I und rtT128N genauso effektiv senkt wie beim Wt. Bei der Mutation rtN236T zeigte sich eine stark verminderte Suszeptibilität gegenüber TNV, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Somit konnte in den phänotypischen Analysen dieser Arbeit die im Vorfeld gezeigte genotypische Assoziation mit einer Therapieresistenz der Mutationen rtT128I und rtT128N bestätigt werden. Ein zusätzlicher Effekt der Mutation rtE263D auf die verminderte Sensitivität rtN248H zeigte sich nicht. Weiterhin konnte mit TNV eine suffiziente Senkung der Viruslast bei den Mutationen rtT128I und rtT128N erzielt werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Doktorarbeit haben gezeigt, dass neben den bekannten antiviralen Resistenzmutationen gegenüber ADV, wie zum Beispiel rtN236T, weitere Mutationen im Polymerasegen für ein schlechtes Ansprechen verantwortlich bleiben. Hinsichtlich einer Verbesserung des Managements von CHB-Patienten mit schlechtem oder Nichtansprechen auf eine antivirale Therapie, unterstreichen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit die weiterhin hohe Relevanz genotypischer und phänotypischer Resistenzanalysen.

Literaturverzeichnis

- Allen, M. I. *et al.* (1998) 'Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine', *Hepatology*, 27(6), pp. 1670–1677. doi: 10.1002/hep.510270628.
- Amini-Bavil-Olyaei, S. *et al.* (2010) 'Differential Impact of Immune Escape Mutations G145R and P120T on the Replication of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus e Antigen-Positive and -Negative Strains', *Journal of Virology*, 84(2), pp. 1026–1033. doi: 10.1128/JVI.01796-09.
- Angus, P. *et al.* (2003) 'Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase', *Gastroenterology*, 125(2), pp. 292–297. doi: 10.1016/S0016-5085(03)00939-9.
- Asabe, S. *et al.* (2009) 'The Size of the Viral Inoculum Contributes to the Outcome of Hepatitis B Virus Infection', *Journal of Virology*, 83(19), pp. 9652–9662. doi: 10.1128/JVI.00867-09.
- Bartholomeusz, A. and Schaefer, S. (2004) 'Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods', *Reviews in Medical Virology*. John Wiley & Sons, Ltd., 14(1), pp. 3–16. doi: 10.1002/rmv.400.
- BB Knowles, D. A. (1983) 'Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor'. USA.
- Beck, J. and Nassal, M. (2007) 'Hepatitis B virus replication.', *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(1), pp. 48–64. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.48.
- Berting, A. *et al.* (1995) 'Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein.', *Intervirology*, 38(1–2), pp. 8–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666527>.
- Blumberg, B. S. *et al.* (1967) 'A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis.', *Annals of Internal Medicine*, 66(5), pp. 924–931. doi: 10.7326/0003-4819-66-5-924.
- Bock, C. T. *et al.* (1994) 'Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell.', *Virus genes*, 8, pp. 215–229. doi: 10.1007/BF01703079.
- Bock, C. T. *et al.* (1999) 'Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor', *Hepatology*, 29(4), pp. 1236–1247. doi: 10.1002/hep.510290426.
- Bock, C. T. *et al.* (2001) 'Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome', *J Mol Biol*, 307(1), pp. 183–196. doi: 10.1006/jmbi.2001.4481.
- Bock, C. T. *et al.* (2002) 'Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation', *Gastroenterology*, 122(2), pp. 264–273. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036161381%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=7afaf8044969a6c6928485d255cbc16b>.
- Van Bömmel, F. *et al.* (2010) 'Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues', *Hepatology*, 51(1), pp. 73–80. doi: 10.1002/hep.23246.
- Borroto-Esoda, K., Miller, M. D. and Arterburn, S. (2007) 'Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials', *Journal of Hepatology*, 47(4), pp. 492–498. Available at: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=17692425%5Cnhttp://bf4dv7zn3u.search.serialssolutions.com.myaccess.library.utoronto.ca/?url_ver=Z39.88-

Anhang und Literaturverzeichnis

2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft_id=info:sid/Ovid:med5&rft.

Brunelle, M.-N. *et al.* (2005) 'Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir', *Hepatology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 41(6), pp. 1391–1398. doi: 10.1002/hep.20723.

Buckwold, V. E. *et al.* (1997) 'Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication', *Journal of General Virology*, 78(8), pp. 2055–2065. doi: 10.1099/0022-1317-78-8-2055.

Carman, W. . *et al.* (1989) 'MUTATION PREVENTING FORMATION OF HEPATITIS B e ANTIGEN IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B INFECTION', *The Lancet*, 334(8663), pp. 588–591. doi: 10.1016/S0140-6736(89)90713-7.

Chang, K. M. and Liu, M. (2016) 'Chronic hepatitis B: Immune pathogenesis and emerging immunotherapeutics', *Current Opinion in Pharmacology*, pp. 93–105. doi: 10.1016/j.coph.2016.07.013.

Chang, T.-T. *et al.* (2010) 'Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(2), pp. 422–30. doi: 10.1002/hep.23327.

Chen, M. *et al.* (2005) 'Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins.', *Journal of virology*, 79(5), pp. 3016–27. doi: 10.1128/JVI.79.5.3016-3027.2005.

Chisari, F. V, Isogawa, M. and Wieland, S. F. (2010) 'Pathogenesis of hepatitis B virus infection.', *Pathologie-biologie*, 58(4), pp. 258–66. doi: 10.1016/j.patbio.2009.11.001.Pathogenesis.

Chung, G. E. *et al.* (2011) 'Add-on adefovir is superior to a switch to entecavir as rescue therapy for lamivudine-resistant chronic Hepatitis B', *Digestive Diseases and Sciences*, 56(7), pp. 2130–2136. doi: 10.1007/s10620-010-1561-2.

Damerow, H. *et al.* (2010) 'Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: Hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern', *Journal of Medical Virology*, 82(11), pp. 1850–1858. doi: 10.1002/jmv.21902.

Dane, D. S., Cameron, C. H. and Briggs, M. (1970) 'VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS', *The Lancet*, 295(7649), pp. 695–698. doi: 10.1016/S0140-6736(70)90926-8.

Das, K. *et al.* (2001) 'Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC).', *Journal of virology*, 75(10), pp. 4771–4779. doi: 10.1128/JVI.75.10.4771-4779.2001.

Delaney, W. E. *et al.* (2006) 'Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), pp. 2471–2477. doi: 10.1128/AAC.00138-06.

Deterding, K. *et al.* (2008) 'Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe', *Journal of Medical Virology*, 80(10), pp. 1707–1711. doi: 10.1002/jmv.21294.

Domingo, E. (2003) 'Quasispecies and the development of new antiviral strategies.', *Progress in drug research*, 60, p. 133. doi: 10.1007/978-3-0348-8012-1_4.

Drexler, J. F. *et al.* (2013) 'Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), pp. 16151–16156. doi: 10.1073/pnas.1308049110.

Drexler, J. F. *et al.* (2013) 'Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents', *PLoS Pathogens*, 9(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1003438.

Dryden, K. A. *et al.* (2006) 'Native Hepatitis B Virions and Capsids Visualized by Electron Cryomicroscopy',

Anhang und Literaturverzeichnis

- Molecular Cell*, 22(6), pp. 843–850. doi: 10.1016/j.molcel.2006.04.025.
- EASL and European Association for the Study of the Liver (2012) 'EASL Clinical Practice Guidelines : Management of chronic hepatitis B virus infection', *Journal of Hepatology*, 57(1), pp. 167–185. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.010.
- Fischer, C. *et al.* (2012) '[Epidemiology and clinical characteristics of patients with chronic hepatitis B (CHB) in Germany - results of a nationwide cross-sectional study].', *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 50(1), pp. 22–29. doi: 10.1055/s-0031-1281628.
- Ganem, D. and Prince, A. M. (2004) 'Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.', *The New England journal of medicine*, 350(11), pp. 1118–1129. doi: 10.1056/NEJMra031087.
- Ghany, M. G. (2017) 'Current treatment guidelines of chronic hepatitis B: The role of nucleos(t)ide analogues and peginterferon', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(3), pp. 299–309. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.04.012>.
- Ghany, M. and Liang, T. J. (2007) 'Drug Targets and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Chronic Hepatitis B', *Gastroenterology*, 132(4), pp. 1574–1585. doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.039.
- Gilead (2010) 'Viread prescribing information 2010'.
- Girones, R. and Miller, R. H. (1989) 'Mutation rate of the hepadnavirus genome', *Virology*, 170(2), pp. 595–597. doi: 10.1016/0042-6822(89)90455-8.
- Glebe, D. *et al.* (2005) 'Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes', *Gastroenterology*, 129(1), pp. 234–245. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.090.
- Glebe, D. and Bremer, C. (2013) 'The molecular virology of hepatitis B virus', *Seminars in Liver Disease*, 33(2), pp. 103–112. doi: 10.1055/s-0033-1345717.
- Glebe, D. and Urban, S. (2007) 'Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry', *World Journal of Gastroenterology*, pp. 22–38. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.22.
- Hadziyannis, S. J. *et al.* (2006) 'Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years', *Gastroenterology*, 131(6), pp. 1743–1751. doi: 10.1053/j.gastro.2006.09.020.
- Huang, C. H. *et al.* (2012) 'Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors', *Journal of Hepatology*, 57(4), pp. 720–729. doi: 10.1016/j.jhep.2012.05.009.
- Huovila, A. P. J., Eder, A. M. and Fuller, S. D. (1992) 'Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment', *Journal of Cell Biology*, 118(6), pp. 1305–1320. doi: 10.1083/jcb.118.6.1305.
- Iavarone, M. *et al.* (2003) 'Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection', *Journal of Hepatology*, 39(2), pp. 253–261. doi: 10.1016/S0168-8278(03)00217-4.
- Inoue, J. *et al.* (2009) 'Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis', *Virology*, 395(2), pp. 202–209. doi: 10.1016/j.virol.2009.09.028.
- Ito, K. *et al.* (2009) 'Characterization of genotype-specific carboxyl-terminal cleavage sites of hepatitis B virus e antigen precursor and identification of furin as the candidate enzyme.', *Journal of virology*, 83(8), pp. 3507–17. doi: 10.1128/JVI.02348-08.
- Janssen, H. L. A. *et al.* (2005) 'Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomised trial', *Lancet*, 365(9454), pp. 123–129. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17701-0.

Anhang und Literaturverzeichnis

- Jones, S. A. and Hu, J. (2013) 'Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention', *Emerging Microbes & Infections*, 2(9), p. e56. doi: 10.1038/emi.2013.56.
- Jung, S. Y. and Kim, Y. J. (2013) 'C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage', *Cancer Letters*, 331(1), pp. 76–83. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.004.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. and Schaller, H. (1990) 'A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA.', *The EMBO Journal*, 9(10), pp. 3389–3396.
- Kann, M. and Gerlich, W. H. (1994) 'Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus.', *Journal of virology*, 68(12), pp. 7993–8000.
- Kay, A. and Zoulim, F. (2007) 'Hepatitis B virus genetic variability and evolution', *Virus Research*, 127(2), pp. 164–176. doi: 10.1016/j.virusres.2007.02.021.
- Kew, M. C. (2011) 'Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Blackwell Publishing Asia, 26, pp. 144–152. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x.
- Knaus, T. and Nassal, M. (1993) 'The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function', *Nucleic Acids Research*, 21(17), pp. 3967–3975. doi: 10.1093/nar/21.17.3967.
- Von Laer A, Simeonova Y, Harder T, Zimmermann R, D.-V. S. (2017) 'Virushepatitis B und D im Jahr 2016', *Epid Bull*, (31), pp. 97 – 30. doi: 10.17886.
- Lambert, C., Döring, T. and Prange, R. (2007) 'Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin.', *Journal of virology*, 81(17), pp. 9050–60. doi: 10.1128/JVI.00479-07.
- Lampertico, P. et al. (2007) 'Low Resistance to Adefovir Combined With Lamivudine: A 3-Year Study of 145 Lamivudine-Resistant Hepatitis B Patients', *Gastroenterology*, 133(5), pp. 1445–1451. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.079.
- Lau, G. K. K. et al. (2005) 'Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B.', *The New England journal of medicine*, 352(26), pp. 2682–2695. doi: 10.1056/NEJMoa043470.
- Lazarevic, I. (2014) 'Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances', *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), pp. 7653–7664. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7653.
- Lee, C. et al. (2006) 'Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 332(7537), pp. 328–336. doi: 10.1136/bmj.38719.435833.7C.
- Lee, H. G. et al. (1997) 'Peptide-specific CTL induction in BHV-seropositive PBMC by stimulation with peptides in vitro: Novel epitopes identified from chronic carriers', *Virus Research*, 50(2), pp. 185–194. doi: 10.1016/S0168-1702(97)00068-3.
- Lee, K. and Chu, C. K. (2001) 'Molecular modeling approach to understanding the mode of action of L-nucleosides as antiviral agents', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), pp. 138–144. doi: 10.1128/AAC.45.1.138-144.2001.
- Lee, Y. S. et al. (2006) 'Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy', *Hepatology*, 43(6), pp. 1385–1391. doi:

10.1002/hep.21189.

Levero, M. *et al.* (2009) 'Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection', *Journal of Hepatology*, pp. 581–592. doi: 10.1016/j.jhep.2009.05.022.

Lewin, S. R. *et al.* (2001) 'Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: Complex decay profiles observed', *Hepatology*, 34(5), pp. 1012–1020. doi: 10.1053/jhep.2001.28509.

Liao, Y. *et al.* (2012) 'Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: Evidence from an updated meta-analysis', *PLoS ONE*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0038394.

Liaw, Y.-F. *et al.* (2004) 'Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease.', *The New England journal of medicine*, 351(15), pp. 1521–1531. doi: 10.1056/NEJMoa033364.

Lim, Y.-S. *et al.* (2017) 'Monotherapy with tenofovir disoproxil fumarate for multiple drug-resistant chronic hepatitis B: 3-year trial', *Hepatology*, 66(3), pp. 772–783. doi: 10.1002/hep.29187.

Littlejohn, M., Locarnini, S. and Yuen, L. (2016) 'Origins and evolution of hepatitis B virus and hepatitis D virus', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1). doi: 10.1101/cshperspect.a021360.

Liu, Y., Miller, M. D. and Kitrinos, K. M. (2014) 'HBV clinical isolates expressing adefovir resistance mutations show similar tenofovir susceptibilities across genotypes B, C and D', *Liver International*, 34(7), pp. 1025–1032. doi: 10.1111/liv.12343.

Livingston, S. E. *et al.* (2007) 'Clearance of Hepatitis B e Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B and Genotypes A, B, C, D, and F', *Gastroenterology*, 133(5), pp. 1452–1457. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.010.

Locarnini, S. *et al.* (2004) 'Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B.', *Antiviral therapy*, 9(5), pp. 679–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15535405>.

Locarnini, S. and Omata, M. (2006) 'Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance', *Liver International*, pp. 11–22. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01371.x.

Lok, A. S. F. *et al.* (2003) 'Long-Term Safety of Lamivudine Treatment in Patients with Chronic Hepatitis B', *Gastroenterology*, 125(6), pp. 1714–1722. doi: 10.1053/j.gastro.2003.09.033.

Lok, A. S. F. *et al.* (2016) 'Antiviral therapy for chronic hepatitis B viral infection in adults: A systematic review and meta-analysis', *Hepatology*, pp. 284–306. doi: 10.1002/hep.28280.

Lürmann, A. (1885) 'Eine Icterus-epidemie', *Ber Klin Wochenschr.*, (22), pp. 20–23.

MacCALLUM FO, McFARLAN AM, MILES JA, POLLOCK MR, W. C. (1951) 'Infective hepatitis; studies in East Anglia during the period 1943-47.', *Spec Rep Ser Med Res Counc (G B)*., 273, p. 1–144.

Magiorkinis, E. N. *et al.* (2005) 'Re-analysis of a human hepatitis B virus (HBV) isolate from an East African wild born Pan troglodytes schweinfurthii: Evidence for interspecies recombination between HBV infecting chimpanzee and human', *Gene*, 349, pp. 165–171. doi: 10.1016/j.gene.2004.12.021.

Mak, L.-Y. *et al.* (2017) 'Hepatitis B core protein as a therapeutic target', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Taylor & Francis, 21(12), pp. 1153–1159. doi: 10.1080/14728222.2017.1397134.

Marcellin, P., Chang, T.-T., *et al.* (2008) 'Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, pp. 750–8. doi: 10.1002/hep.22414.

Marcellin, P., Heathcote, E. J., *et al.* (2008) 'Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B.', *The New England journal of medicine*, 359(23), pp. 2442–2455. doi: 10.1056/NEJMoa0802878.

Margeridon-Thermet, S. *et al.* (2009) 'Ultra-Deep Pyrosequencing of Hepatitis B Virus Quasispecies from Nucleoside and Nucleotide Reverse-Transcriptase Inhibitor (NRTI)-Treated Patients and NRTI-Naive

Anhang und Literaturverzeichnis

- Patients', *The Journal of Infectious Diseases*, 199(9), pp. 1275–1285. doi: 10.1086/597808.
- Messageot, F. *et al.* (2003) 'Proteolytic processing of the Hepatitis B virus e antigen precursor: Cleavage at two furin consensus sequences', *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), pp. 891–895. doi: 10.1074/jbc.M207634200.
- Michailidis, E. *et al.* (2012) 'Antiviral therapies: Focus on hepatitis B reverse transcriptase', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, pp. 1060–1071. doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.006.
- Moraleda, G. *et al.* (1997) 'Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus.', *Journal of virology*, 71(12), pp. 9392–9399. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Motavaf, M. *et al.* (2013) 'Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein.', *Acta virologica*, pp. 389–396. doi: 10.4149/av.
- Müller C (2009) 'Therapie der chronischen Hepatitis B: Resistenzmechanismen gegen Hemmer der HBV-Polymerase', *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 7(4), pp. 7–10.
- Murakami, E. *et al.* (2016) 'Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones', *Journal of Infection*, 72(1), pp. 91–102. doi: 10.1016/j.jinf.2015.09.038.
- Nash, K. (2009) 'Telbivudine in the treatment of chronic hepatitis B', *Advances in Therapy*, pp. 155–169. doi: 10.1007/s12325-009-0004-y.
- Nassal, M. (2008) 'Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way', *Virus Research*, 134(1–2), pp. 235–249. doi: 10.1016/j.virusres.2007.12.024.
- Norder, H. *et al.* (2004) 'Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes', *Intervirology*, 47(6), pp. 289–309. doi: 10.1159/000080872.
- Nowak, M. A. *et al.* (1996) 'Viral dynamics in hepatitis B virus infection', *PROC NATL ACAD SCI U S A*, 93(9), pp. 4398–4402. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L26144299%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.9.4398>.
- Paraskevis, D. *et al.* (2013) 'Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates', *Hepatology*, 57(3), pp. 908–916. doi: 10.1002/hep.26079.
- Patient, R. *et al.* (2007) 'Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking', *Journal of Virology*, 81(8), pp. 3842–3851. doi: 10.1128/JVI.02741-06.
- Patterson, S. J. *et al.* (2011) 'Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B', *Gut*, 60(2), pp. 247–254. doi: 10.1136/gut.2010.223206.
- Poch, O. *et al.* (1989) 'Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements.', *The EMBO journal*, 8(12), pp. 3867–74. doi: 10.1093/emboj/16.6.1248.
- Prange, R., Clemen, A. and Streeck, R. E. (1991) 'Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins.', *Journal of virology*, 65(7), pp. 3919–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=241429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qi, X. *et al.* (2007) 'In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents', *Antivir Ther*, 12(3), pp. 355–362. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591025>.
- Rabe, B. *et al.* (2003) 'Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), pp. 9849–9854. doi: 10.1073/pnas.1730940100.

Anhang und Literaturverzeichnis

- Richman, D. D. (2000) 'The impact of drug resistance on the effectiveness of chemotherapy for chronic hepatitis B', *Hepatology*, W.B. Saunders, 32(4), pp. 866–867. doi: 10.1053/jhep.2000.18194.
- Roseman, A. M. *et al.* (2005) 'A structural model for maturation of the hepatitis B virus core.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), pp. 15821–15826. doi: 10.1073/pnas.0504874102.
- Sandhu, P. *et al.* (2017) 'Hepatitis B virus immunopathology, model systems, and current therapies', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2017.00436.
- Sarin, S. K. *et al.* (2016) 'Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update', *Hepatology International*, pp. 1–98. doi: 10.1007/s12072-015-9675-4.
- Scaglione, S. J. and Lok, A. S. F. (2012) 'Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice', *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.044.
- Schmitz, A. *et al.* (2010) 'Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket', *PLoS Pathogens*, 6(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1000741.
- Schuch, A., Hoh, A. and Thimme, R. (2014) 'The role of natural killer cells and CD8+ T cells in hepatitis B virus infection', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2014.00258.
- Schulze, A., Gripon, P. and Urban, S. (2007) 'Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans', *Hepatology*, 46(6), pp. 1759–1768. doi: 10.1002/hep.21896.
- Seeger, C. and Mason, W. S. (2000) 'Hepatitis B virus biology.', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64(1), pp. 51–68. doi: 10.1128/MMBR.64.1.51-68.2000.
- Seitz, S. *et al.* (2007) 'Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions', *EMBO Journal*, 26(18), pp. 4160–4167. doi: 10.1038/sj.emboj.7601841.
- Shaw, T., Bartholomeusz, A. and Locarnini, S. (2006) 'HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation', *Journal of Hepatology*, pp. 593–606. doi: 10.1016/j.jhep.2006.01.001.
- Sheldon, J. and Soriano, V. (2008) 'Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp. 766–768. doi: 10.1093/jac/dkn014.
- Sirma, H. *et al.* (1999) 'Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx', *Oncogene*, 18(34), pp. 4848–4859. doi: 10.1038/sj.onc.1202867.
- Snow-Lampart, A. *et al.* (2011) 'No resistance to tenofovir disoproxil fumarate detected after up to 144 weeks of therapy in patients monoinfected with chronic hepatitis B virus', *Hepatology*, 53(3), pp. 763–773. doi: 10.1002/hep.24078.
- Steitz, T. A. (1999) 'DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms', *Journal of Biological Chemistry*, pp. 17395–17398. doi: 10.1074/jbc.274.25.17395.
- Summers, J., O'Connell, A. and Millman, I. (1975) 'Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(11), pp. 4597–601. doi: 10.1073/pnas.72.11.4597.
- Sunbul, M. (2014) 'Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance', *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), pp. 5427–5434. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5427.
- Svarovskaia, E. S. *et al.* (2013) 'Hepatitis B virus wild-type and rtN236T populations show similar early HBV DNA decline in adefovir refractory patients on a tenofovir-based regimen', *Journal of Viral Hepatitis*, 20(2), pp. 131–140. doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01638.x.

Anhang und Literaturverzeichnis

- Szmuness, W. *et al.* (1980) *Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States.*, *The New England journal of medicine*. doi: 10.1056/NEJM198010093031501.
- Tacke, F. and Kroy, D. C. (2016) 'Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance', *Annals of Translational Medicine*, 4(18), pp. 334–334. doi: 10.21037/atm.2016.09.19.
- Tai, D. I. *et al.* (2009) '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*, 49, pp. 1859–1867. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22878>.
- Tan, J. *et al.* (2008) 'Tenofovir monotherapy is effective in hepatitis B patients with antiviral treatment failure to adefovir in the absence of adefovir-resistant mutations', *Journal of Hepatology*, 48(3), pp. 391–398. doi: 10.1016/j.jhep.2007.09.020.
- Tatematsu, K. *et al.* (2009) 'A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J', *Journal of Virology*, 83(20), pp. 10538–10547. doi: 10.1128/JVI.00462-09.
- Tenney, D. J. *et al.* (2009) 'Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years-of therapy', *Hepatology*, 49(5), pp. 1503–1514. doi: 10.1002/hep.22841.
- Terrault, N. A. *et al.* (2015) 'AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B', *Hepatology*, p. n/a-n/a. doi: 10.1002/hep.28156.
- Torresi, J. *et al.* (2002) 'Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene', *Virology*, 299(1), pp. 88–99. doi: 10.1006/viro.2002.1448.
- Valaydon, Z. S. and Locarnini, S. A. (2017) 'The virological aspects of hepatitis B', *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, pp. 257–264. doi: 10.1016/j.bpg.2017.04.013.
- Villeneuve, J.-P. *et al.* (2003) 'Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient', *Journal of Hepatology*, 39(6), pp. 1085–1089. doi: 10.1016/j.jhep.2003.09.022.
- Villet, S. *et al.* (2006) 'Selection of a Multiple Drug-Resistant Hepatitis B Virus Strain in a Liver-Transplanted Patient', *Gastroenterology*, 131(4), pp. 1253–1261. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.013.
- Villet, S. *et al.* (2008) 'Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure', *Journal of Hepatology*, 48(5), pp. 747–755. doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.027.
- Villet, S. *et al.* (2009) 'In Vitro Characterization of Viral Fitness of Therapy-Resistant Hepatitis B Variants', *Gastroenterology*, 136(1). doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.068.
- Walker, C. (2009) *Therapie der chronischen Hepatitis B Virus Infektion: Geno- und phänotypische Analyse der Selektion von Resistenzmutationen unter antiviraler Therapie mit Nukleos(tid)analoga*. Tübingen: Universität Tübingen.
- Wang, H. *et al.* (2015) 'Comparison of the efficacy of tenofovir monotherapy versus tenofovir-based combination therapy in adefovir-experienced chronic hepatitis B patients: a systematic review and meta-analysis', *Int J Clin Exp Med*, 8(11), pp. 20111–20122. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26884924>.
- Warner, N. and Locarnini, S. (2008) 'The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound', *Hepatology*, 48(1), pp. 88–98. doi: 10.1002/hep.22295.

Anhang und Literaturverzeichnis

- Watanabe, T. *et al.* (2007) 'Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), pp. 10205–10210. doi: 10.1073/pnas.0704000104.
- Wei, Y. *et al.* (2010) 'Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene.', *Pathologie-biologie*, 58(4), pp. 267–272. doi: 10.1016/j.patbio.2010.03.005.
- Werle-Lapostolle, B. *et al.* (2004) 'Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy', *Gastroenterology*, 126(7), pp. 1750–1758. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.018.
- WHO (2017) *Global Hepatitis Report 2017*.
- Wieland, S. F. and Chisari, F. V (2005) 'Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses', *The Journal of Virology*, 79(15), pp. 9369–9380. doi: 10.1128/JVI.79.15.9369.
- Xu, C. *et al.* (2014) 'Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma', *Cancer Letters*. Elsevier, 345(2), pp. 216–222. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.035.
- Yadav, V. and Chu, C. K. (2004) 'Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: A molecular dynamics study', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(16), pp. 4313–4317. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.05.075.
- Yan, H. *et al.* (2012) 'Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus', *eLife*, 2012(1). doi: 10.7554/eLife.00049.
- Yang, H. *et al.* (2002) 'Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(2), pp. 464–473. doi: 10.1053/jhep.2002.34740.
- Yotsuyanagi, H. *et al.* (1998) 'Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B', *Hepatology*, 27(5), pp. 1377–1382. doi: 10.1002/hep.510270526.
- Zarski, J. P. *et al.* (2006) 'Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: Predominant frequency of HBe antigen negative cases', *Journal of Hepatology*, 45(3), pp. 355–360. doi: 10.1016/j.jhep.2006.03.007.
- Zhang, Y. Y. and Summers, J. (2000) 'Low dynamic state of viral competition in a chronic avian hepadnavirus infection.', *Journal of virology*, 74(11), pp. 5257–65. doi: 10.1128/JVI.74.11.5257-5265.2000.
- Zoulim, F. and Durantel, D. (2015) 'Antiviral therapies and prospects for a cure of chronic hepatitis B', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4). doi: 10.1101/cshperspect.a021501.
- Zoulim, F. and Locarnini, S. (2009) 'Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues', *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.063.

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank an alle Kollegen und Freunde, die mich an der Fertigstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Im Besonderen danke ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Claus-Thomas Bock, der diese Doktorarbeit betreut hat und mich fortwährend unterstützt hat diese Doktorarbeit zu verwirklichen. Weiterhin möchte ich mich bei Christine Walker bedanken, ohne deren Voruntersuchungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die mich in die Methodik eingearbeitet hat. Weiterhin möchte ich Bernd Köberlein, Agnes Bryniok, Buy Tien Sy und Boris Ratsch, die mich inhaltlich bei der Durchführung der Versuche beraten und betreut haben. Für die moralische Unterstützung während der Zeit in den Laboren danke ich Rosa Mammato, Friederike Utta und Maria Martin.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern Petra und Alex, dass sie es mein Leben lang schon so gut mit mir ausgehalten haben.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Doktorarbeit wurde in der Abteilung für molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen und in der Fachgebiet 15 Virale Gastroenteritis- und Hepatitisserreger und Enteroviren des Robert Koch Instituts Berlin unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. C.-T. Bock durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. rer. nat. C.-T. Bock. Diese Arbeit knüpft an die Dissertation von Dr. med. C. Walker aus dem Jahr 2009 an. Für diese Arbeit wurden Daten der Vorgängerarbeit teilweise zitiert, die Stellen sind in den Quellen angegeben und als solche gekennzeichnet.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. med. C. Walker, Dr. rer. nat. B. Koeberlein, A. Byrniok, B. Ratsch M. Martin von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte eigenständig durch mich. Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Prof. Dr. rer. nat C.-T- Bock. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den 17.02.2018

C.-M. Wollboldt