

Aus der Abteilung Allgemeine Virologie  
des Heinrich-Pette-Instituts für Experimentelle Virologie und Immunologie  
an der Universität Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. Hans Will

Analyse von  
virusspezifischen Resistenzfaktoren und  
phylogenetischer Entwicklung  
von Hepatitis B Viren unter Therapie mit Adefovir

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt von

Cynthia I. F. Olotu  
aus Hamburg

bei der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 13.02.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hans Will

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Hüseyin Sirma

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Martina Sterneck

# INHALTSVERZEICHNIS

---

---

<b>0. FRAGESTELLUNG</b>	<b>5</b>
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
Aufbau und Replikation des Hepatitis B Virus	6
Die verschiedenen Genotypen des Hepatitis B Virus	10
Die Entstehung und Bedeutung von Mutationen des Hepatitis B-Virus	12
Natürliche Varianten des Hepatitis B-Virus	14
Mutationen im HBe-Leserahmen	
Mutationen im HBc-Leserahmen	
Mutationen im HBs-Leserahmen	
Diagnostik und Therapie der chronischen Hepatitis B	16
Nukleosidanaloga	20
Adefovir	
Resistenzbildung und Therapieversagen	
Zelluläre Resistenzmechanismen	
Virale Resistenzmechanismen	
Evolution und Phylogenie von Hepatitis B Viren im Verlauf der Infektion	29
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>Material</b>	<b>31</b>
Bakterien-Material	
Zellkultur	
Weitere Puffer und Lösungen	
Enzyme	
Oligonukleotide	
Kits	
Plasmide	
Zellen	
Geräte	
<b>Methoden</b>	<b>36</b>
Einverständniserklärung der Patienten	<b>36</b>
Blutentnahmen und Patientenkollektiv	36
DNA-Extraktion aus Serumproben	38
Amplifikation von HBV-Genomen	38
Amplifikation des gesamten HBV-Genomes	
Verfahren mit Proben bei niedrigen HBV-Titern	
Aufreinigung der amplifizierten HBV-DNA aus PCR-Ansätzen	41
Klonierung der amplifizierten HBV-DNA	42
Transformation der Plasmide in E.Coli	43
DNA-Extraktion aus Bakterien	43
Restriktionsverdau der DNA	43
DNA-Konzentrationsbestimmung	44
Sequenzierung der HBV-DNA	44
Verwendete Sequenzierprimer	
Gerichtete Mutagenese	44
Plasmid Maxi Präparation	48
Zellkultursysteme und –experimente	48
Transfektion	
Behandlung der Zellen mit Nukleosidanaloga	
Ernte der Zellüberstände	50

Ernte der Zellen	51
Phenol-Chloroform-Extraktion	51
Southern Blot	51
Herstellung einer radioaktiven Sonde	
Hybridisierung der Membran und Auswertung der Signale	
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<hr/>	
Korrelation von HBsAg und HBV-DNA im Serum	<b>56</b>
Infektion und Verlauf, Sequenzierung der Klone, Phylogenie von:	
Patient 1	57
Patient 2	60
Patient 3.	65
Patient 4	68
Patient 5	72
Patient 6	75
Patient 7	78
Patient 8	82
Patient 9	86
Patient 10	89
Patient 11	91
Patient 12	96
Patient 13	99
Patient 14	103
Phänotypisierung der Mutante rtl233V	107
Mutationen innerhalb des HBsAg	110
Verteilung der Mutationen innerhalb der RT-Domäne	114
Die genetische Divergenz der Viruspopulationen	122
Positive und neutrale Selektion von HBV-Klonen unter ADF-Therapie	128
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>133</b>
<hr/>	
Adefovir-Therapie, Patientenkollektiv und HBV-Mutationsanalysen	133
Modifikationen des HBs-Proteins durch Mutationen in der HBV-RT-Domäne	135
Phänotypisierung der Mutation rtl233V	137
Patienten ohne Resistenzmutationen: andere mögliche Ursachen der Resistenz	137
Adefovir-Therapie: Selektionsdruck auf HBV-Populationen	139
Phylogenie und Evolution von Hepatitis B Viren unter Adefovir-Therapie	140
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>143</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>144</b>
<b>ALPHABETISCHES LITERATURVERZEICHNIS, NACH ERSTAUTOREN</b>	<b>157</b>
<b>VII. ANHANG</b>	<b>167</b>
<b>VIII. DANKSAGUNG</b>	<b>168</b>
<b>IX. BEREITS VERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE</b>	<b>169</b>

## 0. FRAGESTELLUNG

---

Chronische Hepatitis B Infektionen sind weit verbreitet – in Deutschland ist etwa eine halbe Millionen Menschen betroffen, weltweit sind es über 350 Millionen. Etwa 1 Million davon stirbt jedes Jahr an den Spätfolgen der Erkrankung: Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome. Seit einigen Jahren stehen – zumindest in den reichen Industrienationen – Nukleosidanaloga als neue Hoffnungsträger der Therapie zur Verfügung. Durch die Selektion von resistenten Hepatitis B Viren wird jedoch auch hier der Behandlungserfolg eingeschränkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung von Resistenzmechanismen in der Therapie der chronischen Hepatitis B mit dem Nukleotidanalogen Adefovir. Dabei steht vor allem die Frage im Vordergrund, inwiefern Sequenzmuster bzw. Mutationen innerhalb der Reversen Transkriptase mit Therapieresistenz korreliert werden können. Dazu sollten HBV-Populationen aus den Seren von 14 chronisch HBV-infizierten Patienten, bei denen durch Adefovir kein Therapieerfolg erzielt werden konnte, kloniert und sequenziert werden. Mutationen, die dabei im Verdacht standen, Resistenz gegenüber Adefovir zu vermitteln, sollten in einem dafür entwickelten Zellkultursystem *in-vitro* phänotypisiert werden. Durch die Sequenzierung der Reversen Transkriptase verschiedener HBV-Klone pro Patient vor und nach Adefovirtherapie soll Aufschluss über Evolutionsdynamik und Veränderungen von HBV-Populationen unter antiviraler Therapie gewonnen werden.

## I. EINLEITUNG

---

Kaum eine andere Infektionskrankheit betrifft weltweit annähernd so viele Menschen wie Hepatitis B: trotz einer seit 1982 verfügbaren Impfung stellt diese Erkrankung weiterhin eine globale Herausforderung dar. Die WHO geht von zwei Milliarden stattgefundenen Infektionen aus, in über 350 Millionen Fällen resultierten daraus chronische Hepatiden [1]. Die Prävalenz beträgt dabei in Deutschland lediglich ca. 0,2% [2]; Hepatitis B ist in erster Linie eine Geißel der schwächer entwickelten Regionen – endemisch südlich der Sahara, in Asien und Südamerika, aber auch in Südosteuropa – wo sich die meisten Infektionen bereits perinatal oder in frühester Kindheit ereignen. Je früher die Infektion stattfindet, desto wahrscheinlicher ist die Chronifizierung der Infektion und damit auch das Auftreten von Spätschäden wie hepatozellulären Karzinomen oder Leberzirrhose.

In unseren Breiten kann nach Infektion mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit (90%) von einer folgenlosen Remission ausgegangen werden, wobei die Infektion bei zwei Dritteln der Betroffenen symptomlos abläuft. In ca. 30% der Fälle entwickelt sich eine akute Hepatitis, bei nur ca. einem Prozent der Infizierten wird ein fulminanter Verlauf beobachtet. Jede zehnte HBV-Infektion führt zur Persistenz viraler Proteine im Serum des Patienten (HBsAg, s.u.). Es besteht dann in der Regel ein asymptomatischer Trägerstatus; innerhalb dieses Kollektives manifestiert sich bei bis zu einem Drittel der Patienten eine chronische Hepatitis, die über die Jahre zu Leberzirrhose und Leberkarzinom führen kann.

### **Aufbau und Replikation des Hepatitis B Virus**

Die humanen Hepatitis B Viren gehört zur Familie der Hepadnaviridae. Die Mitglieder der Familie Hepadnaviridae zeichnen sich durch eine ausgeprägte Wirts- und Gewebespezifität aus. Vertreter dieser Familie kommen in zahlreichen Tierarten – in Primaten wie auch in Vögeln und Nagern – endemisch vor (z.B. bei Peking-Enten, Gänsen, Erdhörnchen, Graureihern und Wollaffen), besitzen jedoch nicht immer eine pathogene Wirkung. Wesentliche Erkenntnisse über HBV wurden durch Experimente an diesen animalen Hepatitis-Viren gewonnen.

Humane Hepatitis B Virionen haben einen Durchmesser von ca. 42 nm. Die äußerste Begrenzung bildet eine Lipidmembran, in die in der Regel die Oberflächenproteine S (*small*), M (*medium*) und L (*large*) eingelagert sind, dabei macht das S-Protein den Hauptbestandteil aus. Das kleine Oberflächenprotein S wird von den befallenen Leberzellen in Form subviraler Partikel sezerniert und ist als HBsAg in großen Mengen im

Blut HBV-infizierter Personen nachweisbar. HBsAg ist der früheste Marker einer HBV-Infektion. Eine erfolgreiche Impfung gegen HBV induziert die Bildung neutralisierender Antikörper gegen HBsAg und schafft damit Immunität.

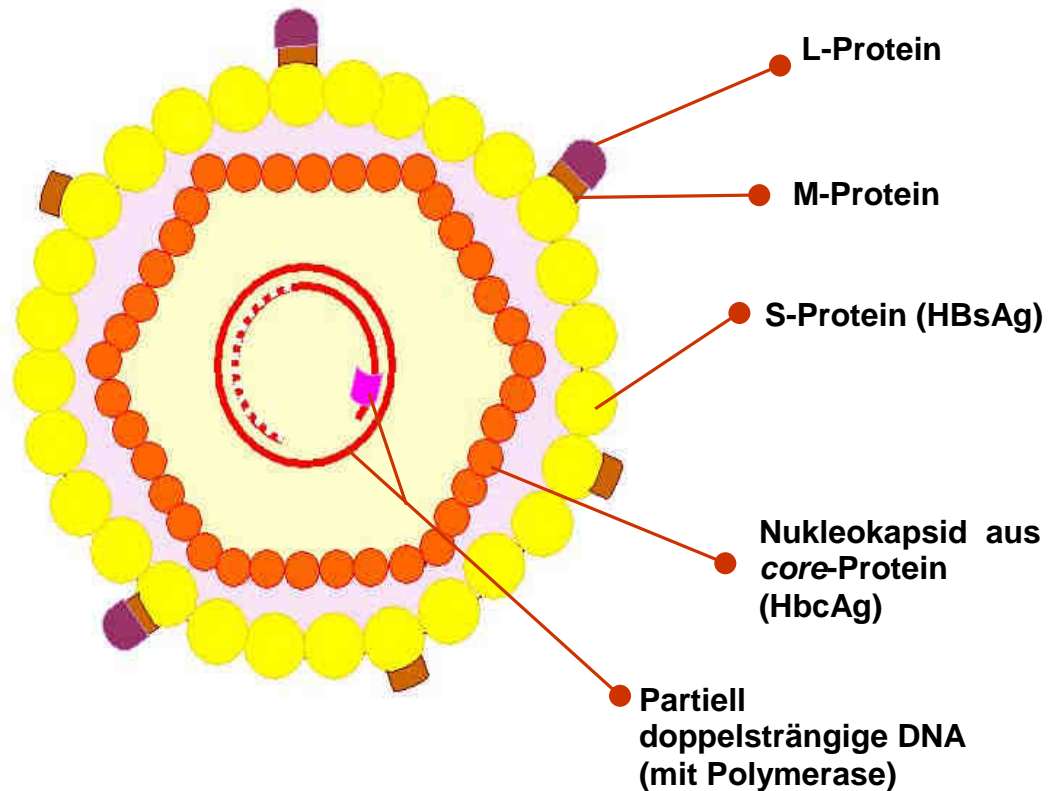


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus mit Virushülle, Nukleokapsid und Genom

Im Inneren des Virus liegt das DNA-Genom, umgeben von einem Nukleokapsid aus *core*-Proteinen (HBcAg). Der Nachweis von HBcAg im Blut ist beweisend für eine HBV-Infektion. Das Genom des Virus liegt in Form eines zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA-Moleküls vor, dabei ist der DNA-Plusstrang kürzer als der Minusstrang. Das gesamte Genom des Hepatitis B Virus ist – in doppelsträngiger, zirkulärer Form – ca. 3200 Basenpaare lang und damit relativ klein (im Vergleich Genome von anderen DNA-Viren: Humanes Herpesvirus I: 152200 bp, Variola major Virus: 200000 bp, Zytomegalievirus: 240000 bp). Nach dem Eintritt des viralen Genomes in den Nukleus der Wirtszelle wird der offene DNA-Plusstrang geschlossen und in eine zirkuläre Form überführt.

Das HBV-Genom kodiert für vier Klassen von Proteinen: für das C-, das X-, das P- sowie für das S-Protein. Das S-Gen verfügt neben der eigentlichen S-Domäne zusätzlich über eine PräS2- und PräS1-Domäne. Das große HBV-Oberflächenprotein L setzt sich aus

allen drei Anteilen zusammen, das mittlere aus der S- und PräS2-Domäne und für das kleine S-Protein kodiert ausschließlich die S-Domäne.

Aus dem C-Gen entsteht im Verlauf der viralen Replikation zusätzlich zu dem Core-Protein (Nukleokapsid) ein Vorläuferprotein – das Präcore. Im Verlauf der Translation und später noch einmal bei der Sekretion des Proteins wird jeweils ein kurzes Peptid (zunächst N-, dann C-terminal) abgespalten und so das HBeAg gebildet. HBeAg ist im Blut HBV-Infizierter nachweisbar und besitzt vermutlich immunmodulatorische Funktionen [158].

Das X-Gen kodiert für das in seinen Eigenschaften bisher noch vergleichsweise wenig verstandene HBx-Protein. Ihm werden u.a. regulatorische Funktionen bei der Transkription und vielen Signalkaskaden zugeschrieben [3]. Auch bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms, einer Spätfolge der chronischen HBV-Infektion, soll dem HBx-Protein eine wichtige Rolle zukommen [4,5].

Die HBV-Polymerase besteht aus verschiedenen funktionellen Einheiten – dem sogenannten N-terminalen Protein, dem *Spacer*, der reversen Transkriptase (RT-Domäne) und der RNase H [6]. Die HBV-Polymerase ist an ihrem N-terminalen Anteil kovalent mit dem viralen Genom verbunden, der *Spacer* – eine eher variable Region – liegt zwischen dieser Bindungsstelle und den restlichen beiden katalytischen Domänen des Proteins [7]. Zwischen der HBV-Polymerase und der des humanen Immunschwäche-Virus (HIV) besteht im Bezug auf diese beiden Bereiche, die RNase H und die RT-Domäne, strukturelle Ähnlichkeit.

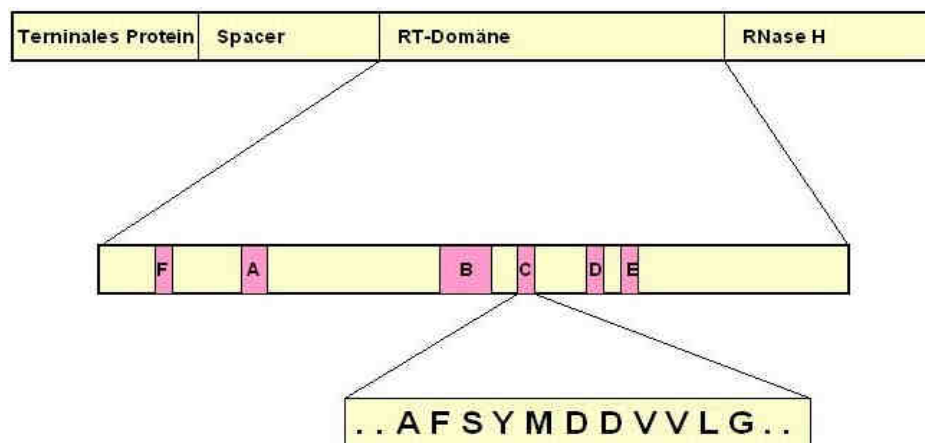


Abb. 1.2 Schema der HBV-Polymerase und ihrer verschiedenen funktionellen Bereiche. Innerhalb der RT-Domäne sind die konservierten Regionen A-F dargestellt. Innerhalb der Region C liegt der Kern des aktiven Zentrums des Enzyms mit seinem charakterischen Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat-Motiv (YMDD).



Die HBV-Reverse Transkriptase, insgesamt 344 Aminosäuren lang, besitzt sechs konservierte Bereiche (A-E), wobei das aktive Zentrum des Enzyms durch ein charakteristisches Aminosäuremotiv in der C-Region markiert wird (Tyrosin, Methionin, 2x Aspartat; YMDD) [8]. Dieses Motiv besitzt insofern besondere Bedeutung, als ein einzelner hier lokalisierter Aminosäureaustausch das Virus unempfindlich gegen das gebräuchliche Virostatikum Lamivudin machen kann. Dieses Nucleosidanalogon stellt immer noch eine der Säulen der Therapie der chronischen Hepatitis B dar (s.u.).

Nachdem ein Hepatitis B Virus in einen Hepatozyten eindringen konnte, wird das Nucleokapsid aktiv in den Zellkern transportiert [9]. Im Zellkern wird das virale Genom in kovalent geschlossene, zirkuläre DNA umgewandelt (*covalently closed circular, ccc-DNA*).

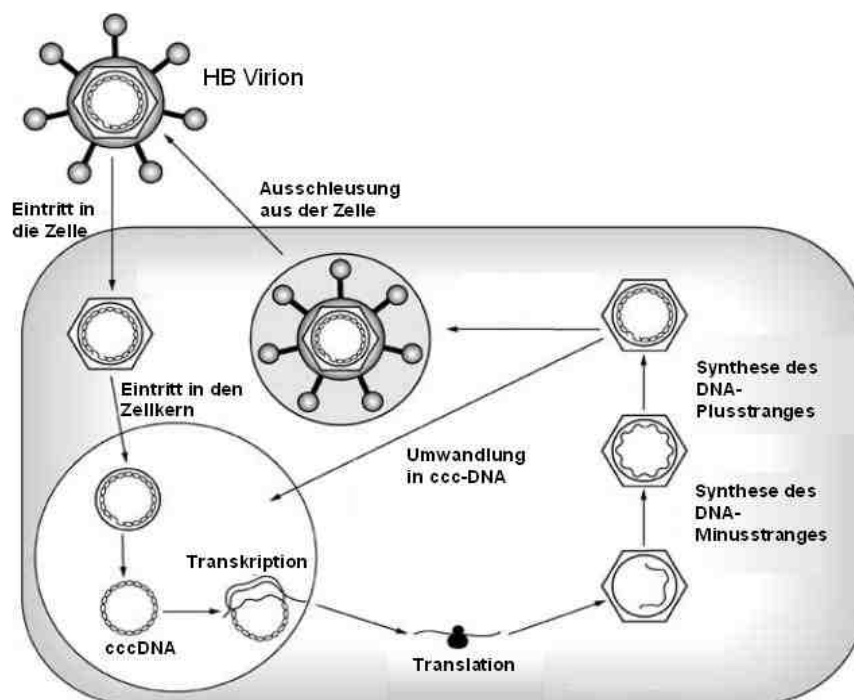


Abb. 1.3 Übersicht über die Replikation des Hepatitis B Virus. Nach der Aufnahme des Virus in den Hepatozyten wird das Nucleokapsid mit dem viralen Genom in den Zellkern transportiert. Im Zellkern wird das offene HBV-Genom in ccc-DNA umgewandelt. Durch zelluläre Enzyme erfolgt die Transkription der ccc-DNA in verschiedene mRNAs, aus denen später virale Proteine translatiert werden. Eine dieser mRNAs, die prägenomische RNA interagiert im Zytosol mit dem sich aus HBcAg neu formenden Nucleokapsid. Im Nucleokapsid erfolgt die Synthese des DNA-Minusstrangs an der prägenomischen RNA. Nach dem Verdau der RNA durch die RNase H-Aktivität wird der DNA-Plusstrang gebildet. Schließlich liegt wieder ein offenes, partiell doppelsträngiges HBV-Genom vor. Einige neu gebildete HBV-Genome gehen wieder in den ccc-DNA-Pool über, der Großteil verläßt die Zelle (durch Knospung, „*budding*“) nach Passage des Endoplasmatische Retikulum.

Abbildung modifiziert aus Fung et al., 2004 [10]

Es folgt die Transkription der viralen DNA durch zelluläre Enzyme. Eine der entstehenden mRNAs, die so genannte prägenomische RNA, dient als Vorlage für die spätere Synthese des viralen Genomes.

Erst innerhalb der Nukleokapside, die sich im Zytosol bilden, beginnt die virale Polymerase mit der Replikation des HBV-Genomes. Die reverse Transkriptase synthetisiert anhand der prägenomischen RNA zunächst den DNA-Minusstrang, dieser dient dann als Matrize für den kürzeren DNA-Plusstrang. Die RNA des Prägenomes wird mit fortschreitender Synthese des DNA-Minusstranges von der RNase H –Aktivität sukzessiv bis auf einen kleinen Rest verdaut.

### Die verschiedenen Genotypen des Hepatitis B-Virus

In den siebziger Jahren beschrieb Le Bouvier erstmalig die natürliche Variabilität von Hepatitis B-Viren (HBV) [11]. Anhand serologischer Analysen des S-Proteins wurden die bekannten HBV-Stränge schließlich in die 9 Subtypen (bzw. Serotypen) ayw1-4, ayr, adw2, adw4q-, adr<sub>q</sub>+ und adr<sub>q</sub>- eingeteilt. Die verschiedenen Subtypen ließen sich in ihrer Verteilung bestimmten geographischen Regionen zuordnen.

Erst Ende der achtziger Jahre deutete sich eine Neuordnung der bekannten HBV Stämme an. Okamoto et al. nahmen als erste eine Einteilung anhand von Nukleotidsequenzen vor [12]. Inzwischen unterscheidet man 8 verschiedene Genotypen, A – H. Zur Bestimmung und Einteilung der Genotypen wurden die Sequenzen verschiedener Gene – besonders die Precore-Region – aber auch das gesamte Genom herangezogen [13].

Genotyp	A	B	C	D	E	F	G	H
Serotyp	adw2 ayw1	adw2 adw3 ayw1	adr adr <sub>q</sub> - adr <sub>q</sub> + ayr adw2 adw3 ayw ayw3	ayw2 ayw3 ayw4 adw3	ayw4	adw4q- adw4 adw	adw2	adw4

Tab. 1.1 Übersicht über die heute bekannten Serotypen und ihre Zuordnung zu den 8 HBV-Genotypen (nach Norder et al., 2004 [14] )

Die vielen heute bekannten HBV-Serotypen lassen sich den Genotypen zuordnen und bilden Untergruppen, anhand derer sich die phylogenetische Entwicklung der HB-Viren nachvollziehen lässt [14].

In der klinischen Praxis hat die Bestimmung der HBV-Serotypen heute ihre Bedeutung verloren – nicht so die der Genotypen. Innerhalb eines Genotyps liegt die Divergenz der einzelnen HBV-Stämme stets unter 4%, zwischen den verschiedenen Genotypen beträgt sie hingegen über 8%.

Trotz Migrationsbewegungen und internationalem Tourismus lässt sich die Verteilung der einzelnen HBV-Genotypen eindeutig bestimmten geographischen Regionen zuordnen. Während in Nord- und Westeuropa sowie Nordamerika (und in einer Variante auch in Südafrika) hauptsächlich Genotyp A anzutreffen ist, überwiegen in Südostasien HBV-Infektionen mit den Genotypen B und C. Genotyp E findet sich in der Regel in West- und Südafrika; in Süd- und Zentralamerika herrscht Genotyp F vor. Genotyp G trat bisher in Frankreich und den USA auf. Der erst kürzlich beschriebene Genotyp H wurde in Zentralamerika nachgewiesen [15], während der am meisten verbreitete Genotyp D auf allen Kontinenten vorkommt. In vielen Regionen sind Koinfektionen mit zwei Genotypen weit verbreitet (Bowyer, Sim 2000) [16].

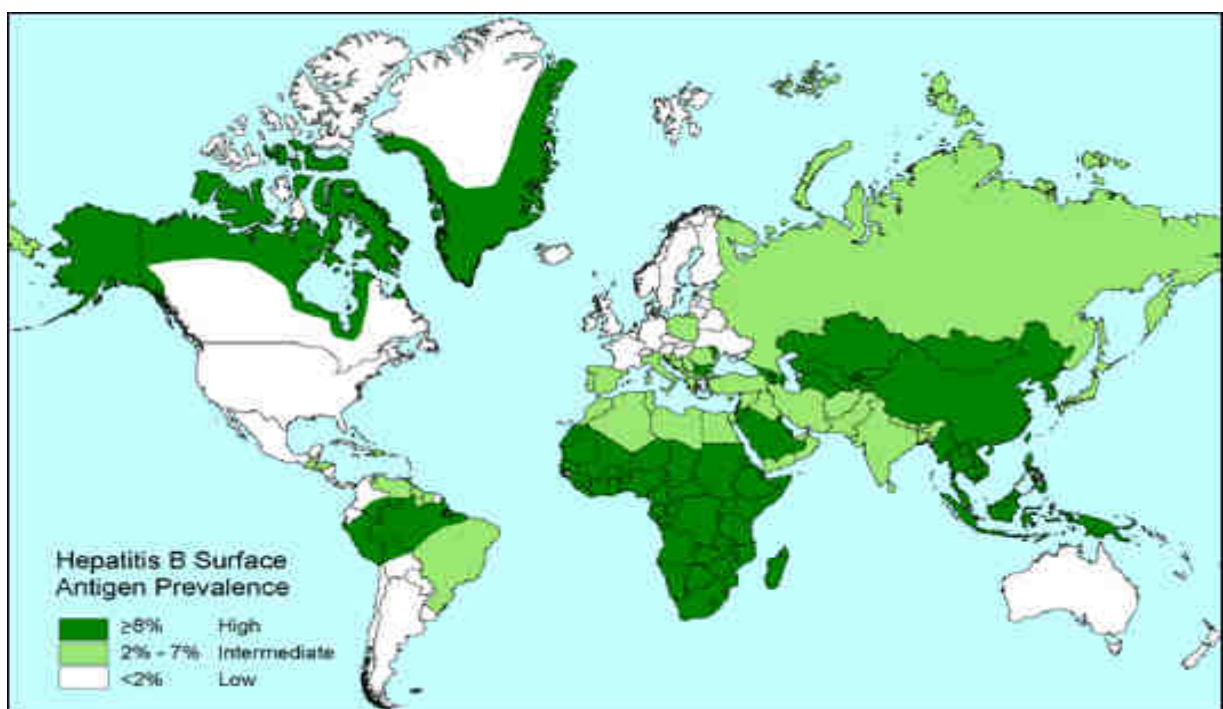


Abb.1.4 Weltweite Verbreitung des Hepatitis B Virus anhand von der Prävalenz von HBsAg in der Bevölkerung. [17]

Die Krankheitsverläufe nach HBV-Infektion lassen gelegentlich Genotyp-spezifische Tendenzen erkennen: so konnte eine große taiwanische Studie zeigen, dass die Mehrzahl der Patienten mit Leberzirrhose unter einer Infektion mit HBV Genotyp C litten (Kao et al 2000) [18]; während eine andere Studie nachwies, dass Infektionen mit HBV-Genotyp B in Thailand eher mit einem asymptomatischen Trägerstatus korrelierten [19]. Patienten mit HBV-Infektionen vom Genotyp A oder D wiesen in der Regel eine höhere Virämie auf als sie bei Infektionen mit Genotypen B und C vorkam (Westland et al 2003) [20]. Ein Vergleich aller sieben Genotypen untereinander steht allerdings noch aus; meist wurden zwei endemische HBV-Genotypen innerhalb eines Patientenkollektivs verglichen. Auch zwischen den verschiedenen Serotypen bzw. Subgruppen existieren Unterschiede bezüglich klinischem Verlauf und Behandlungserfolg. So beobachtet man bei mit *adw*-Stämmen infizierten Patienten gegenüber Patienten mit *ayw* HBV-Infektionen ein 20-fach erhöhtes Risiko, eine Resistenz gegen das Hepatitis B – Medikament und Nukleosidanalogen Lamivudin zu entwickeln. [21]

## **Die Entstehung und Bedeutung von Mutationen des Hepatitis B-Virus**

Als Mutation bezeichnet man eine zufällige Veränderung der Nukleotidabfolge innerhalb des viralen Genoms. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen und vielen anderen DNA-Viren besitzt die Polymerase des humanen Hepatitis B Virus keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (sog. *proof-reading activity*), d.h. sie kann den Einbau falscher Nukleotide in den neu entstehenden Strang nicht wieder korrigieren. Während des viralen Replikationszyklus kommt es daher zwangsläufig immer wieder zu Fehlern in der DNA-Synthese. Die Fehlerrate der HBV-Polymerase wird auf ca. 1/1600 Basenpaaren geschätzt [22]. Diese relativ hohe Fehlerrate der viralen Polymerase, zusammen mit der ausgeprägten Replikationseffizienz des HB-Virus mit geschätzten  $10^{11}$  Virionen/Tag [23] ist für die Entstehung von ca.  $2 \times 10^4$  Substitutionen/Nukleotid/Jahr [24] verantwortlich.

Durch die kompakte Organisation des HBV-Genomes mit seinen vier, sich größtenteils überlappenden Leserahmen (*open reading frames, ORFs*) ohne intergenische Regionen – jedes Nukleotid ist Teil eines Codons – bedingt ein Nukleotidaustausch in einem Genomabschnitt fast immer auch eine entsprechende Änderung im überlappenden *ORF*. Dadurch wird die Anzahl der möglichen replikationsfähigen Mutationen stark eingeschränkt und ist *in vivo* niedriger, als man aufgrund der hohen geschätzten Fehlerrate der Polymerase erwarten würde. Eine Mutation in einem viralen Protein, z.B. in der RT-Domäne der Polymerase, führt häufig auch zu Veränderungen in anderen viralen Proteinen (z.B. HBs), und kann damit multiple Auswirkungen auf den Phänotyp des Virus nach sich ziehen.

Mutationen treten zufällig und innerhalb des gesamten viralen Genoms auf. In der Regel sind die für die Funktion eines Proteins essentiellen Nukleotidsequenzen stark konserviert, da Mutationen in diesen Bereichen die Replikationsfähigkeit des Virus aufheben oder sehr einschränken. Solche Mutanten können sich aber unter hohem Selektionsdruck, wie z.B. während einer antiviralen Therapie, etablieren und werden gegebenenfalls, sobald dieser wegfällt, vom Wildtyp wieder verdrängt. Mutationen in hochkonservierten Regionen, besonders innerhalb der RT-Domäne, sind typisch für die Vermittlung von Resistenz gegen Nukleosidanaloga. Wird das Virus einem Selektionsdruck ausgesetzt, können so Mutationen, die der Mutante unter den erschwerten Lebensbedingungen einen Vorteil sichern, selektioniert werden.

Nach einer HBV-Infektion wirkt zunächst das Immunsystem des Wirtes als wichtigster Selektionsfaktor auf das Virus ein. HBV-Mutationen, die klassische T- oder B-Zell-Epitope so verändern, dass eine effektive Immunreaktion gegen das Virus verhindert wird, sind selten, aber beschrieben [25]. Durch eine Impfung gegen HBV kommt es zur Induktion von Antikörpern gegen das virale Oberflächenprotein HBsAg. Auch die passive Immunisierung gegen Hepatitis B wird mit Anti-HBs Immunglobulinen durchgeführt. In beiden Fällen richten sich diese Antikörper hauptsächlich gegen eine besonders immunogene Region des HBsAg, die sogenannte „a“-Determinante (s.u.) und üben einen bedeutenden Selektionsdruck auf das Virus aus. Hepatitis B Viren mit einem veränderten HBsAg können der Neutralisation durch spezifische Antikörper entkommen und werden deshalb auch als *escape*-Mutanten bezeichnet. In einigen Regionen der Welt stellen *escape*-Mutanten schon heute ein erhebliches Problem dar [26].

Es ist bekannt, dass im Verlauf einer Hepatitis B -Exazerbation bestimmte Mutanten selektioniert werden, insbesondere solche mit Veränderungen in hoch-immunogenen Regionen, wie z.B. der relativ variablen PräS-Region der Hüllproteine (Brunetto et al., 1999 [24]). Humane Hepatitis B Viren sind mit Ausnahme einiger Varianten selber nicht direkt zytotoxisch. Die Erkrankung wird daher indirekt durch die – in erster Linie durch T-Zellen und Zytokine vermittelte – Immunreaktion des Wirtes, die sich gegen infizierte Hepatozyten richtet, bestimmt. HBV-Proteine mit hoher Antigenität können eine Exazerbation der Erkrankung, einen sogenannten *flare*, verursachen [27,28]. Mutationen können die Immunogenität von viralen Proteinen herabsetzen, und dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber der HBV-Wildtyp-Population bedingen. Die verminderte Immunantwort führt bei dem Patienten dann zu einer Remission.

In den letzten Jahren hat – bedingt durch die Einführung neuer Therapiemöglichkeiten – das Aufkommen neuer Mutationen unter dem Selektionsdruck antiviraler Medikamente besonders an Bedeutung gewonnen.

## **Natürliche Varianten des Hepatitis B-Virus**

### Mutationen im HBe-Leserahmen

Das HBeAg des Hepatitis B Virus, dem immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, scheint für die Replikation des Virus nicht essentiell zu sein [29]. Es existieren natürliche HBV-Varianten, die durch Mutationen in der PräC-Region (Bestandteil des Core-Leserahmens) die Fähigkeit zur HBe-Synthese verloren haben [30]. Dabei unterscheidet man verschiedene Arten von Mutationen in der PräC-Region, solche, die das Startcodon des Gens verändern, solche, die ein Stopp-Codon innerhalb der PräC-Region kreieren, sowie Frameshift-Mutationen (die den Leserahmen verschieben) und Mutationen innerhalb des basal core promoters der PräC-Region (BCP), dem als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Synthese von Core- und PräC m-RNA zukommt [31].

Mutationen in der Region des BCP betreffen – bedingt durch den kompakten, überlappenden Aufbau des HBV-Genoms – auch den HBx-Leserahmen. Je nach Art der Mutation führt dies zur Synthese eines veränderten oder verkürzten Proteins. Welche Auswirkungen solche Veränderungen innerhalb des HBx-Leserahmens auf Replikationsfähigkeit und Krankheitsverlauf haben, ist noch nicht bekannt [32]. Im Bereich des BCP kommt es gehäuft an Position 1762 und 1764 zum Nukleotidaustausch, dies wirkt sich in vitro in einer verminderten HBeAg-Sekretion aus, die eine gesteigerte Immunreaktion des Wirtes – und damit eventuell eine Exazerbation der Erkrankung - mit sich ziehen kann. [33]

Die häufigste Mutation im HBc betrifft einen Guanin-zu-Adenin-Austausch an Position 1896, der das vorletzte Codon des PräC-Leserahmens in ein Stopp-Codon umwandelt.

Im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion kann es nach einer Phase der Immunaktivierung zum Überwiegen von HBe-Defektmutanten kommen, häufig im Vorfeld einer Serokonversion [35]. Nach HBe-Serokonversion – dem Auftreten von Antikörpern gegen HBeAg, während das Antigen an sich nicht mehr nachgewiesen werden kann – gehen in der Regel die Symptome der Erkrankung zurück und das histologische Bild der Leber bessert sich. Das Auftreten von Spätfolgen wird dadurch allerdings nicht beeinflusst (Günther et al 1999 [34]).

## Mutationen im HBc-Leserahmen

Mutationen, die den HBc-Leserahmen verändern – am häufigsten beobachtet man einen Phenylalanin/Isoleucin-zu-Leucin-Austausch an Position 97 - beeinträchtigen den intrazellulären Aufbau der viralen Partikel und reduzieren die HBV-Sekretion aus infizierten Hepatozyten [36]. Innerhalb des HBc befinden sich viele B- und T-Zell-Epitope, sodass man von einer immunogenen Selektion solcher Mutationen ausgehen kann [34].

## Mutationen im HBs Leserahmen

Es existieren natürliche Varianten mit Veränderungen innerhalb der Leserahmen der drei Oberflächenproteine. Sie befinden sich in der PräS1-, PräS2- wie auch der S-Region.

Innerhalb der PräS1-Region sind insbesondere Deletionen von Bedeutung, die je nach ihrer Position in 4 verschiedene Typen, A-D, eingeteilt werden [34]. Diese Mutationen findet man in allen Stadien der Erkrankung, meist als minore Subpopulation. Deletionen innerhalb der PräS1-Region können die Funktion des PräS2/S-Promotors beeinträchtigen und zu einem Ungleichgewicht zu Gunsten von PräS1-mRNA gegenüber PräS2/S-mRNA mit entsprechend veränderter Proteinsynthese führen. Im Tierversuch konnten zytotoxische Effekte durch Überexpression und intrazelluläre Kumulation des L-Proteins (PräS1-Leserahmen) beobachtet werden [25].

Im Gegensatz zu PräS1-Mutationen treten Deletionen innerhalb der PräS2-Region bevorzugt in späteren Stadien der Erkrankung auf und werden häufig in zeitlichen Zusammenhang mit HBe- und HBs-Serokonversion gebracht. Hepatitis B Viren mit Deletionen, die das PräS2-Startcodon beeinträchtigen, können kein M-Protein (PräS2-Leserahmen) synthetisieren.

Innerhalb des HBsAg liegen viele Epitope von B- und T-Zellen. Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang die sogenannte „a“-Determinante des HBsAg (s.o., Aminosäuren 121-149), eine immunogene Region, die an der Oberfläche von subviralen Partikeln und Virionen exponiert wird. Durch HBs-Antikörper werden vermutlich besonders Mutationen innerhalb der a-Determinante selektioniert. Die a-Determinante verfügt vermutlich über eine 3-Schleifen-Konfiguration, die durch Disulfidbrücken aufrechterhalten wird. Veränderungen innerhalb dieser SH-reichen Regionen wirken sich deutlich auf die Antigenität des Virus aus. Solche Mutationen treten besonders im zeitlichen Zusammenhang mit anti-HBs-Serokonversion bei HBV-Infizierten auf.

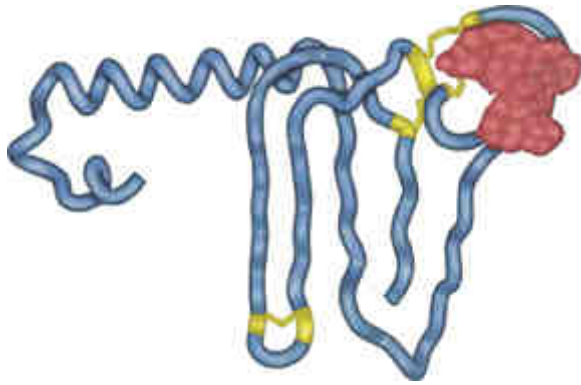


Abb. 1.5 Die Modellstruktur des HBsAg. Die immunogene „a“-Determinante ist rot hervorgehoben. Disulfidbrücken sind gelb markiert. (Chen et al., 1996 ) [37]

Im Rahmen von großen Impfprogrammen in Endemiegebieten fanden sich HBs-Mutationen, gegen die eine Impfung nicht schützen konnte (*escape*-Mutanten) mit einer Inzidenz von 2-3% [33]. Insbesondere der Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin an Position 145 verändert die a-Determinante derart, dass sie von durch die Impfung gebildeten Antikörpern nicht mehr erkannt wird. Mutanten mit veränderter a-Determinante müssen also als potentiell globales Gesundheitsrisiko beobachtet werden, da sie in der Lage sind, geimpfte Personen (auch bei Simultanimpfung von HBsAg-Vakzine und anti-HBs-Ig) mit normalerweise ausreichenden Antikörper-Titern zu infizieren.

## Diagnostik und Therapie der chronischen Hepatitis B

Die folgenden Therapiekonzepte entsprechen dem aktuellen Standard in Deutschland und richten sich nach den Empfehlungen der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten und dem Kompetenznetz Hepatitis. [38]

Bei Verdacht auf eine HBV-Infektion wird die virologisch-serologische Diagnostik eingeleitet, bestehend aus Bestimmung von HBsAg, HBeAg, anti-HBc- sowie ggf. anti-HBe-Antikörpern. Im Falle einer HBsAg-negativen Hepatitis B (in ca. 5% der akuten Verläufe) stützt sich die Diagnosestellung zusätzlich auf den Nachweis von spezifischen anti-HBc-IgM und einer HBV-DNA-Quantifizierung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion).

Im Gegensatz zu geimpften Personen, bei denen sich ausschließlich anti-HBs nachweisen lässt, ist das Vorhandensein von anti-HBc-Antikörpern ein eindeutiger Indikator für eine stattgefundene HBV-Infektion. Wie bei anderen infektiösen Prozessen



auch, kann IgM in hoher Konzentration nur kurz nach Antigenkontakt nachgewiesen werden und gibt so Aufschluss über die Bestehensdauer der Infektion.

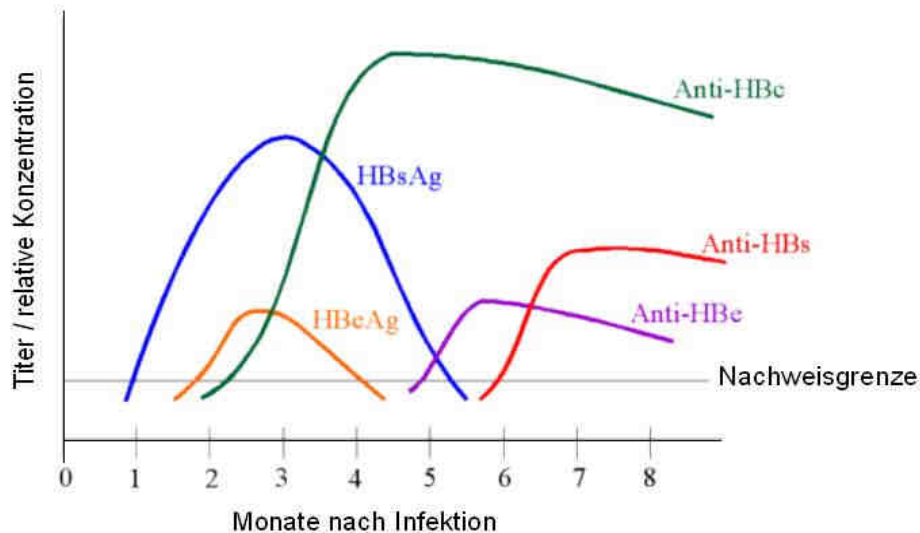


Abb. 1.6 Serologie im Verlauf der Hepatitis B-Infektion

Nicht jede HBV-Infektion ist therapiepflichtig, daher sehen die Leitlinien in Deutschland eine Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen vor. Anhand dieser Kategorisierung kann dann über das weitere therapeutische Vorgehen entschieden werden.

Bei Patienten mit akuter Hepatitis B besteht in der Regel keine Indikation zur Therapie, da es bei diesen Verläufen in bis zu 99 % der Fälle zu einer Spontanremission kommt. Ausnahmen sind die seltenen Fälle der fulminanten Hepatitis.

Patienten mit chronischer Hepatitis B kommen für eine antivirale Therapie in Frage, wobei für die Therapieplanung der quantitative Nachweis der HBV-DNA im Serum nützlich ist.

Um die Therapieplanung zu erleichtern, werden diese Patienten in drei Gruppen eingeteilt. In die erste Gruppe werden diejenigen aufgenommen, die eine hohe Virämie ( $10^7$ - $10^8$  Genomkopien/ml), positives HBeAg und Entzündungsaktivität mit hohen Transaminasen (insbesondere GPT bzw. ALAT) aufweisen. Die zweite Gruppe wird von HBeAg-negativen Patienten mit etwas niedrigerer Virämie, aber meist ebenfalls mit Entzündungszeichen, ausgemacht. In der letzten Gruppe befinden sich Patienten mit sehr niedriger Virämie – teilweise unterhalb der Nachweisgrenze –, ohne nachweisbaren HBeAg, aber mit positivem HBsAg-Status. Bei diesen Patienten finden sich keine oder minimale entzündliche Veränderungen der Leber, die ALAT ist nicht erhöht.

Bei Patienten aus Gruppe 1 und 2 besteht in der Regel die Indikation zur antiviralen Therapie. Von essentieller Bedeutung für die Indikationsstellung ist das histologische Bild der Leber. Entzündliche Veränderungen bzw. hohe ALAT-Spiegel qualifizieren zum Therapiebeginn. Dies gilt besonders für Patienten mit bereits eingetretenen Komplikationen, wie progressiver Fibrose und kompensierter oder dekomensierter Zirrhose. Auch mit Patienten, die nicht primär in eine der drei Gruppen eingeteilt werden können, wird nach diesen Kriterien verfahren. Prädiktiv für ein gutes Therapieansprechen sind hohe ALAT-Ausgangswerte (als Folge der Immunantwort), geringe Virämie, Erstinfektion im Erwachsenenalter, positiver HBeAg-Befund und histologisch ausgeprägte Entzündungszeichen der Leber.

Die Therapie der chronischen Hepatitis B stützt sich auf zwei Säulen: zum einen der wesentlich ältere immunmodulatorische Ansatz, zum anderen die antivirale Therapie, bestehend aus den relativ neuen Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga (Lamivudin und Adefovir, inzwischen auch Entecavir und Telbivudin). Zusätzlich muss, wie bei anderen chronischen Erkrankungen auch, der Lebensstil des Patienten entsprechend angepasst werden, um die Risiken einer alkohol- oder medikamentenbedingten Schädigung der ohnehin schon strapazierten Leber zu minimieren.

Der Behandlungserfolg misst sich an klinischen und virologischen Parametern; die Transaminasespiegel bessern sich, die im Serum nachweisbare Menge an HBV-DNA geht deutlich zurück, im Idealfall unter die Nachweisgrenze. Langfristig kommt es zur Serokonversion und HBsAg kann nicht mehr nachgewiesen werden. Histologisch mindern sich mit zunehmender Therapiedauer die Entzündungszeichen der Leber. Langfristig kommt es seltener zu Spätfolgen (hepatische Dekompensation und hepatozelluläre Karzinome) und dadurch zu einer erhöhten Lebenserwartung von an Hepatitis B erkrankten Patienten.

Interferon  $\alpha$  ist seit Beginn der neunziger Jahre die Standardmedikation gegen chronische Hepatitis B, erste Studien wurden bereits in den siebziger Jahren durchgeführt. Es wird heute vor allem bei HBeAg-positiven Patienten für 4-6 Monate in einer Dosis von 3x 3-10 mio. IE wöchentlich angewandt. Unter Interferonbehandlung kommt es bei ca. einem Drittel [39] der behandelten Patienten zur Senkung der Viruslast, zur HBe Serokonversion, sowie zur Reduktion von Transaminasespiegeln [41] und seltener auch von HBsAg [42]. In vielen Fällen ist im Therapieverlauf keine virale DNA mehr im Serum nachweisbar [43,44]. Unter Interferontherapie scheint es seltener zu erkrankungsassoziierten Komplikationen und Dekompensationen zu kommen [45].

Vor kurzer Zeit wurden neue, pegylierte Interferone mit verbesserter Stabilität erprobt. In Phase II-Studien schienen sie im Hinblick auf ALAT-Spiegel, Virämie und HBeAg-Verlust herkömmlichen Interferonen überlegen zu sein [46]. In der neuesten Hepatitis B – Leitlinie werden sie jetzt erstmals zur primären Therapie chronischer Hepatitis B empfohlen.

Schwierigkeiten ergeben sich in der Behandlung HBV-Infizierter, bei denen sich kein HBeAg im Serum nachweisen lässt (HBeAg-negativ). Im Vergleich mit HBeAg-positiven Patienten sprechen diese schlechter auf Interferon  $\alpha$  an. Um dennoch befriedigende Therapieerfolge zu erlangen, erhöht man die Behandlungsdauer. Empfohlen werden Dosierungen von 3x wöchentlich 6 mio. IE für 12-24 Monate [47].

Eine weitere Schwachstelle der Interferontherapie ist – neben der ausschließlich parenteral möglichen Applikation – das hohe Nebenwirkungsprofil des Medikaments. Es treten grippale Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen und Schüttelfrost auf. Des Weiteren klagen die Patienten häufig über Gewichtsverlust, Haarausfall und Depressionen. Es kommt zu einer Abwehrschwäche, die häufige bakterielle Infekte zur Folge hat. Diese für den Patienten oft sehr belastenden, unerwünschten Wirkungen führen nicht selten zu schlechter Compliance oder gar zum Therapieabbruch. Kontraindikationen der Interferongabe sind u.a. dekompensierte Leberzirrhose, schwere Herzkrankheiten, Immunsuppression, Autoimmun- sowie psychiatrische Erkrankungen [48].

Weitaus einfacher als die Behandlung der Hepatitis B-Infektion ist ihre Prävention. Seit Mitte der achtziger Jahre ist ein Impfstoff aus synthetisch hergestelltem HBsAg erhältlich. Die Impfung führt, je nach Impfalter, in bis zu über 90% der Fälle zu Antikörperbildung und verhindert so eine Infektion [49]. Aus diesem Grund empfiehlt die WHO seit 1992 die generelle Impfung in allen Ländern der Welt. Aufgrund der geringen Wirtsspezifität des Erregers könnte die Erkrankung theoretisch, ähnlich wie die Pocken, durch weltweite Impfungen ausgerottet werden.

Bei erfolgreicher Impfung, die sich aus drei Einzeldosen zusammensetzt, besteht für mindestens 10 Jahre Immunität gegen HBV-Infektionen. Obwohl man von einem längeren Impfschutz ausgeht, wird in Deutschland alle 10 Jahre eine Auffrischung der Impfung empfohlen.

In Deutschland werden, gemäß der Empfehlungen der Ständigen Impfkommission, Neugeborene noch vor Vollendung des zweiten Lebensmonats geimpft. Auch Jugendliche sollten vor Eintritt der Volljährigkeit geimpft werden, ebenso wie Angehörige von Risikogruppen; u.a. alle im Gesundheits- oder Sozialdienst Beschäftigten, aber auch HIV-

Positive, i.v.-Drogenabhängige und Prostituierte, Dialysepatienten oder Patienten vor großen blutungsreichen operativen Eingriffen [50].

Da es bei einem geringen Anteil der Geimpften – besonders bei älteren Männern – zu einer ungenügenden Immunreaktion und damit eventuell zu mangelndem Impfschutz kommt, sollte der Antikörpertiter bei besonders exponierten Personen vier bis acht Wochen nach der Grundimmunisierung bestimmt werden. In Fällen von so genanntem „non-response“ werden bis zu drei zusätzliche Impfungen durchgeführt; meistens wird so schließlich doch noch eine ausreichende Immunität erreicht.

Neben der aktiven Impfung besteht die Möglichkeit einer passiven Immunisierung mit IgG. Davon profitieren in erster Linie Patienten, die sich aufgrund ihrer HBV-assoziierten Leberzirrhose einer Lebertransplantation unterziehen mussten. Um das Risiko einer Transplantat-Reinfektion zu minimieren, erhalten sie eine Rezidivprophylaxe aus Lamivudin und anti-HBV-Immunglobulinen. Auch Neugeborene HBsAg-positiver Mütter werden postpartal sowohl aktiv wie auch passiv immunisiert. Ebenso wird die HBV-Postexpositionsprophylaxe, z.B. nach Nadelstichverletzungen, mit aktiver und passiver Immunisierung innerhalb von 48 h nach dem Risikokontakt durchgeführt.

## **Nukleosidanaloga**

Während Lamivudin – das erste Nukleosidanalogen in der Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion – erst 1999 für diese Indikation zugelassen wurde, sind Medikamente dieser Substanzklasse schon seit mehreren Jahren Standard der HIV-Therapie (*Highly active antiretroviral therapy*, HAART). So war das anti-HIV Nukleosidanalogen AZT (Zidovudin) als erstes antiretrovirales Medikament bereits ab 1987 verfügbar, gefolgt von DDI (Didanosin) 1990 und DDC (Zalcitabin) 1992. Auch das gängige Aciclovir, schon seit 1977 eingesetzt gegen Viren der Herpes-Gruppe (bes. bei Varizella-Zoster-Virus- und Herpes-simplex-Virus-Infektionen), gehört in diese Kategorie.

Bei der Auswahl eines Nukleosidanalogs für die Therapie der chronischen Hepatitis B müssen die antivirale Effektivität des Medikaments, das Krankheitsstadium des Patienten sowie die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Resistenzen berücksichtigt werden. Lange Zeit war Lamivudin das Nukleosidanalogen der ersten Wahl, inzwischen stehen weitere Produkte zur Auswahl. Kombinationstherapien wurden bislang zwar immer wieder gefordert [51,52], doch zunächst nur zögerlich eingesetzt. In Deutschland sind sie in die aktuelle Leitlinie aufgenommen worden.

Substanz	Analogon von	Zulassung
Lamivudin	Cytidin	Hepatitis B, HIV
Adefovir	Adenin	Hepatitis B
Entecavir	Guanin	Hepatitis B
Telbivudin	Thymidin	Hepatitis B
Tenofovir	Cytidin	Hepatitis B, HIV

Tab. 1.2 Übersicht über zur Zeit in der Therapie der chronischen Hepatitis B angewandte Nucleosidanaloga

Bei Medikamenten wie Lamivudin, Adefovir und Entecavir handelt sich um Analoga der zellulären Desoxynucleoside, mit einer im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Molekülen veränderten Base oder Ribose. Nach Einbau des Antimetaboliten in den zu verlängernden Strang kann sich die virale Polymerase aufgrund der modifizierten Struktur des Desoxynucleotides nicht aus dem mit der DNA gebildeten Komplex befreien und wird dadurch inaktiviert. Vielen Nucleosidanaloga fehlt zudem die 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Mit dieser freien Hydroxylgruppe erfolgt bei der DNA-Elongation normalerweise der Angriff des zu verlängernden Stranges an der Pyrophosphatbrücke des neuen Desoxyribonucleotidtriphosphates (dNTP). Ohne diese Gruppe ist eine weitere DNA-Strangverlängerung nicht möglich, und es kommt zum Kettenabbruch.

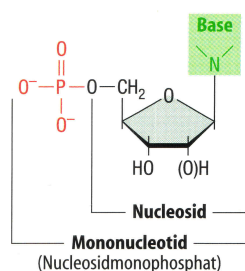


Abb. 1.7 Aufbau von Nucleosid und Nucleotid (aus) [53]

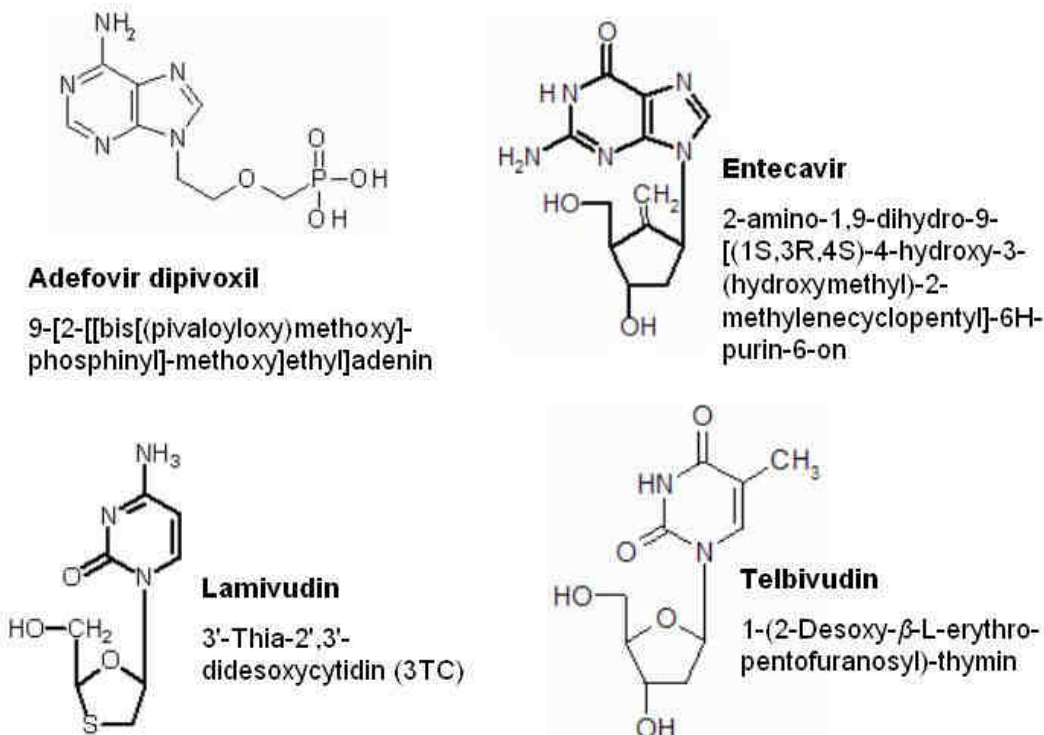


Abb. 1.8 Strukturformeln der gegen chronische Hepatitis B zugelassenen Nucleosidanaloga Adefovir, Lamivudin, Entecavir und Telbivudin

Dieses Prinzip funktioniert sowohl mit Purinnucleosid- wie auch mit Pyrimidinnucleosidanaloga. Da lediglich Nucleosidtriphosphate für die DNA-Synthese verwendet werden können, muss das Nucleosidanalogon nach der Aufnahme noch durch drei Phosphorylierungsschritte in seine aktive Form überführt werden. Diese erfolgen in der Regel durch intrazelluläre Nucleosidkinasen. Dabei stellt die initiale Phosphorylierung den geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der Aktivierung der Nucleosidanaloga dar. Neuere Nucleotidanaloga, wie z.B. Adefovir dipivoxil, enthalten bereits eine Phosphatgruppe. Dadurch kann dieser erste Phosphorylierungsschritt vermieden werden. Indem ein einfach phosphoryliertes Nucleosidanalogon (→Nucleotidanalogon) verabreicht wird, kann so die Bioverfügbarkeit des Medikamentes erhöht werden.

Die ersten Hemmstoffe viraler Replikation wurden Ende der Fünfziger Jahre gegen das Herpes Simplex Virus eingesetzt [54]. Im Gegensatz zu diesen älteren Virostatika, die virale und zelluläre Polymerasen gleichermaßen hemmten – und aufgrund ihrer hohen Toxizität nur lokal angewendet werden durften – wirken neuere Substanzen primär an viralen Strukturen. Dies ist durch die relativ geringe (Substrat-) Selektivität viraler gegenüber eukaryotischen Polymerasen möglich.

## Adefovir

Adefovir, ein Adenosinmonophosphatanalogon, wird in Deutschland seit 2003 zur Therapie der chronischen Hepatitis B angewendet. Damit war es neben Lamivudin bis vor kurzer Zeit das einzig weitere zugelassene Medikament dieser Substanzklasse. Mitte 2006 erhielt Entecavir als drittes Nukleosidanalogen, ein Jahr später Telbivudin als viertes die Zulassung für diese Indikation. Seit April 2008 steht mit Tenofovir ein fünftes Nukleotidanalogen zur Verfügung.

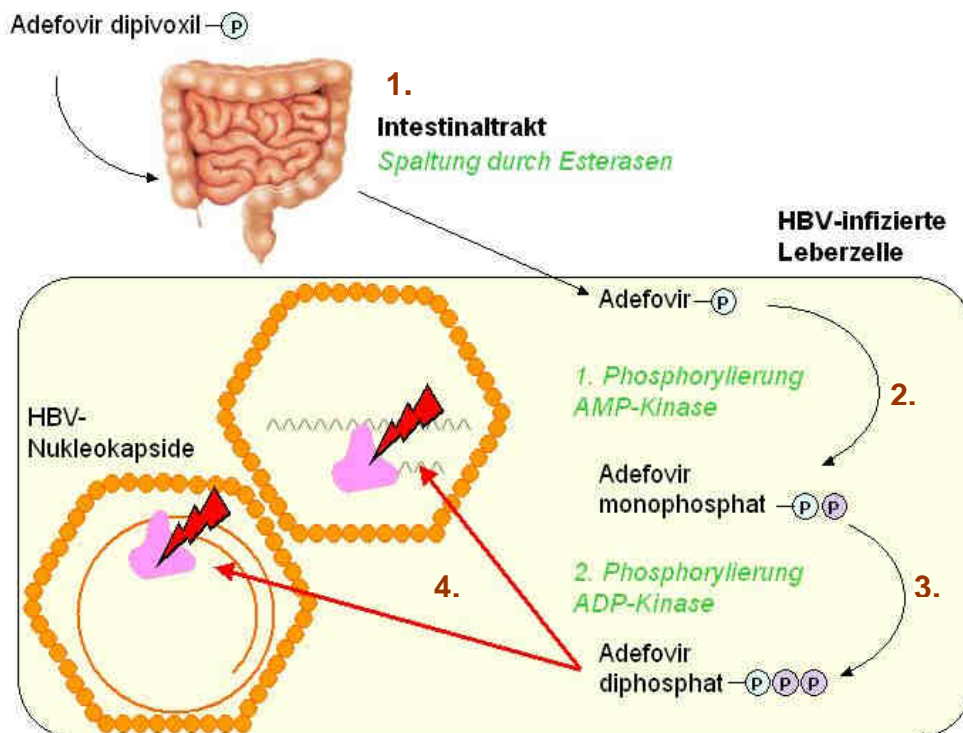


Abb. 1.9 Aktivierung und Wirkung von Adefovir dipivoxil. Nach enteraler Aufnahme erfolgt die Spaltung des *Prodrugs* durch Esterasen im Darm (1). In den Hepatozyten wird Adefovir von Adenosinmonophosphat-Kinasen (AMP-Kinasen) phosphoryliert. Es entsteht Adefovirmonophosphat (2). Die zweite Phosphorylierung erfolgt durch Adenosindiphosphat-Kinasen (ADP-Kinasen), als Adefovirdiphosphat liegt die aktive Form vor, die mit dATP um die virale Polymerase konkurriert (3). Wird Adefovirdiphosphat in den neu entstehenden DNA-Plus- oder Minusstrang eingebaut (4), kommt es zum Kettenabbruch, gleichzeitig wird die virale Polymerase inhibiert.

Das azyklische Nukleotidanalogen wird als Di-Ester-*Prodrug*, Adefovir dipivoxil, verabreicht. Nach enteraler Aufnahme wird das Medikament von intestinalen Esterasen zu Adefovir hydrolysiert und in der Leber von intrazellulären Kinasen zweifach

phosphoryliert. Damit liegt es in seiner aktiven Form, Adefovirdiphosphat, vor. In HBV-infizierten Zellen kompetiert es dann mit dATP um die virale Reverse Transkriptase. Nach Inkorporation in den HBV-DNA-Strang kommt es zum Kettenabbruch, gleichzeitig wird die virale Polymerase inhibiert. Die zellulären DNA-Polymerasen werden dabei nur geringfügig beeinträchtigt, ein Effekt, der pharmakodynamisch vernachlässigt werden kann [55].

Neben diesen direkten Effekten auf die virale Polymerase ist Adefovir auch in der Lage, das intrazelluläre DNA-Reservoir des Virus, den cccDNA-Pool, zu reduzieren [56]. Die vollständige Eliminierung dieser DNA-Form aus den infizierten Zellen wäre die Voraussetzung für eine absolute Virusfreiheit. Bisher konnte sowohl durch Lamivudin als auch durch Adefovir lediglich eine Verringerung des ccc-DNA-Pools erzielt werden [57], auch die Neubildung von ccc-DNA wurde nicht restlos unterdrückt (De Clercq 2003 [56], Delmas 2002 [58]).

Adefovir dipivoxil wird in einer Dosierung von 10 mg p.o. eingenommen. Die Plasma-Halbwertszeit liegt bei ca. 8 Stunden. Die aktive Form, Adefovirdiphosphat, weist jedoch eine ausgeprägte intrazelluläre Stabilität auf. So liegt die Halbwertszeit des Medikaments innerhalb der Hepatozyten weitaus höher und eine einmalige Einnahme pro Tag ist ausreichend. Die Elimination erfolgt renal, bei Niereninsuffizienz muss die Dosierung entsprechend angepasst werden.

Als Nebenwirkungen unter Therapie können Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Übelkeit und abdominale Schmerzen auftreten. Außer bei Allergien auf einen oder mehrere der Inhaltsstoffe von Adefovir dipivoxil existieren keine absoluten Kontraindikationen. Obwohl sich das Medikament im Tierversuch als nicht teratogen erwies, stellen Schwangerschaft und Stillzeit relative Kontraindikationen dar.

Dosislimitierend bei der Gabe von Adefovir dipivoxil ist die Nephrotoxizität des Medikamentes: frühe Studien zeigten eine bessere antivirale Wirksamkeit bei täglicher Gabe von 30 statt 10 mg [59], eine Dosierung, die aufgrund der renalen Nebenwirkungen nicht eingeführt werden konnte. Die Nephrotoxizität ist besonders bei langjähriger Therapie zu beachten, bei Patienten mit Niereninsuffizienz und bei zusätzlicher Einnahme potentiell nierenschädigender Medikamente. Unter Adefovireinnahme sollte in allen Fällen eine regelmäßige Kontrolle der Nierenfunktion stattfinden.

Zu schwereren Vorfällen kann es bei plötzlichem Absetzen der antiviralen Medikation kommen. In solchen Fällen kommt es bei ca. einem Viertel der Patienten zu einer Exazerbation der Erkrankung mit steilem Anstieg von Transaminasen und Virämie. Besonders bei Patienten mit vorgeschädigter Leber (z.B. Zirrhose) können solche



Krankheitsschübe zu hepatischer Dekompensation führen. Nach Therapieabbruch müssen Patienten deshalb besonders engmaschig überwacht werden.

Bei einigen Patienten kann es durch die Einnahme von Nukleosidanaloga zu Laktatazidose, Hepatomegalie und Steatosis kommen. Bei Verdacht auf eine schwere Nebenwirkung, z.B. Anstieg des Serumlaktats, muss die Behandlung unterbrochen werden.

Adefovir besitzt, wie auch andere Nukleosidanaloga zur Therapie der chronischen Hepatitis B (z.B. Lamivudin oder Entecavir), eine dosisabhängige Wirkung gegen HIV. Bei Patienten mit HIV/HBV-Koinfektionen ist deshalb auf die Möglichkeit der HIV-Resistenzentwicklung zu achten.

Adefovir wird ausschließlich durch den US-amerikanischen Pharmakonzern Gilead Sciences vertrieben.

### Resistenzbildung und Therapieversagen

Die Behandlung mit Nukleosidanaloga führt zwangsläufig zur Resistenzentstehung. Diese Problematik ist aus der HIV-Therapie seit langem bekannt, und obwohl HBV zu weniger Resistenzen neigt als vergleichbare Viren [60], führt auch hier die Entwicklung resistenter Mutanten in vielen Fällen zum Therapieversagen.

### Zelluläre Resistenzmechanismen

Da Nukleosidanaloga als Prodrugs verabreicht werden, liegt die Überlegung nahe, dass hier – wie bei der Verstoffwechslung anderer Medikamente auch – mit interindividuellen Unterschieden in Metabolisierung und Transport der Wirkstoffe zu rechnen ist. Die Aufnahme von Nukleosidanaloga in die Zelle wird z.B. durch verschiedene Membrantransporter erleichtert, gleichzeitig schleusen verschiedene ATP-abhängige Efflux-Pumpen, sog. *Multidrug Resistance Proteins* (MRP) sowie P-Glykoprotein (Pgp), Nukleotide wieder aus der Zelle heraus, auch wenn diese nicht ihr natürliches Substrat darstellen. [61] Man kann also von dem Beitrag vieler am Nukleotidstoffwechsel beteiligter Proteine ausgehen.

Jedes Nukleosid wird intrazellulär durch eine spezifische Kinase phosphoryliert (Adenosin → Adenosinmono/diphosphatkinase (AMP, ADP), Guanosin → GMP, GDP etc.). Die verschiedenen Nukleosidkinasen werden, je nach Bedarf, u.a. zellzyklusabhängig aktiviert. Hepatozyten sind mit einer mittleren Lebensdauer von 150 Tagen relativ langlebig und befinden sich überwiegend in der G<sub>0</sub>-Zellzyklusphase, so dass die Leber

eher zu den ruhenden Geweben gerechnet werden muss. Man kann daher davon ausgehen, dass Enzyme der DNA-Replikation – wie z.B. Nukleosidkinasen – in der Leber normalerweise auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden. [62] Insgesamt unterliegt der Nukleosidstoffwechsel komplexen Regulierungsmechanismen, inwiefern zelluläre Prozesse an Nukleosidanaloga-Resistenz und Therapieversagen beteiligt sind, ist in vielen Einzelheiten noch nicht hinreichend bekannt.

### Virale Resistenzmechanismen

Das Prinzip der viralen Resistenzentstehung hingegen ist vergleichsweise einfach erklärt: durch den Selektionsdruck des antiviralen Medikamentes wird der sensitive „Wildtyp“-Virus in seiner Replikationsfähigkeit gehemmt – jedoch nur in einem Maße, in dem immer noch Nachkommenviren synthetisiert werden. Beinhaltet ein Nachkommensvirus eine Veränderung, die es ihm ermöglicht, in Anwesenheit des Virostatikums eine höhere Replikationsfähigkeit als der Wildtyp aufzuweisen, so besitzt dieses Virus einen Selektionsvorteil und stellt bald die dominante Population dar. Fällt der Selektionsdruck weg, kommt es in der Regel rasch wieder zum Überwiegen des Wildtyps (s.o.). Die Voraussetzung für diesen *Shift* in der viralen Population ist freier Replikationsraum, d.h. das Vorkommen von virusfreien Zellen, die von der Mutante infiziert werden können [63]. Wird eine Zelle infiziert, muss – um die effiziente Produktion von Nachkommensviren zu gewährleisten – die ccc-DNA des Virus im Zellkern verbleiben. An ihr erfolgt die Transkription der viralen Proteine und auch der Vorstufe des viralen Genomes, der prägenomischen RNA. Das Vorhandensein von ccc-DNA im Nukleus ist somit die Voraussetzung für eine persistierende Infektion. Man geht davon aus, dass die Menge der vorhandenen ccc-DNA in einer infizierten Zelle regulatorischen Prozessen unterliegt und limitiert ist [64]. So ist die Superinfektion einer bereits mit ccc-DNA „gesättigten“ Zelle schwierig und weitaus weniger effizient als die von virusfreien Zellen [65]. Wird demnach eine dominante Viruspopulation von einer anderen abgelöst, müssen neu infizierbare Zellen vorhanden sein. Im Verlauf einer chronischen Hepatitis B kommt es in der Leber vermehrt zu Umstrukturierungen, Hepatozyten sterben ab und werden durch neue ersetzt. Dabei weisen verschiedene Patienten innerhalb eines Kollektivs erhebliche Unterschiede bezüglich der mittleren Lebensdauer von Hepatozyten auf (10 bis 100 Tage) [66]. Es ergeben sich dadurch individuelle Unterschiede nicht nur im Hinblick auf den Erfolg einer antiviralen Therapie, die nur die Verbreitung neuer Viren, jedoch nicht die persistierende Infektion befallener Zellen verhindern kann. Auch das Aufkommen von neuen, resistenteren Viruspopulationen wird so erleichtert oder erschwert.

Kurz nach der Einführung des Nucleosidanalogons Lamivudin in die HBV-Therapie wurden Berichte über HBV-Stämme mit einem veränderten katalytischen Zentrum in der viralen Polymerase bekannt, die der Therapie nicht mehr zugänglich waren. Das in der C-Domäne der viralen Polymerase liegende YMDD-Motiv war bei diesen Stämmen in YVDD oder YIDD umgewandelt worden (M204V / M204I). Der Austausch von Methionin zu Valin bzw. Isoleucin ändert die Konfiguration des aktiven Zentrums, so dass das Nucleosidanalogon kein Substrat des Enzyms mehr darstellt (*steric hindrance*) [67]. Gleichzeitig senkt diese Mutation die Replikationseffizienz des Virus [68], so dass schon kurz nach Therapieende bzw. Wechsel auf ein anderes Medikament entsprechende HBV-Varianten in vielen Fällen nicht mehr im HBV-Pool des Patienten nachweisbar sind [69,70].

Die Mutationen M204I und M204V finden sich häufig in Kombination mit einer weiteren Mutation, einem Leucin-zu-Methionin Austausch (L180M) innerhalb der B-Domäne der viralen Polymerase. Obwohl diese Mutation alleine kaum Auswirkungen auf die Aktivität der Reversen Transkriptase hat, stellt sie in Kombination mit M204I/V die zuvor verminderte Replikationseffizienz des Virus wieder her. [71] Eine weitere Mutation in der B-Domäne, V173L, scheint ähnliche Auswirkungen zu haben. Sie liegt in der Nähe des konservierten aktiven Zentrums der Polymerase, vermittelt alleine aber keine Resistenz gegenüber Lamivudin. Zusammen mit Resistenzmutationen erhöht jedoch auch sie die virale Replikationsfähigkeit. [72] Häufig tritt V173L zusammen mit M204V/I und L180M auf, findet sich aber auch außerhalb dieser Konstellation (s. Ergebnisse).

RT-Domäne der HBV-Polymerase

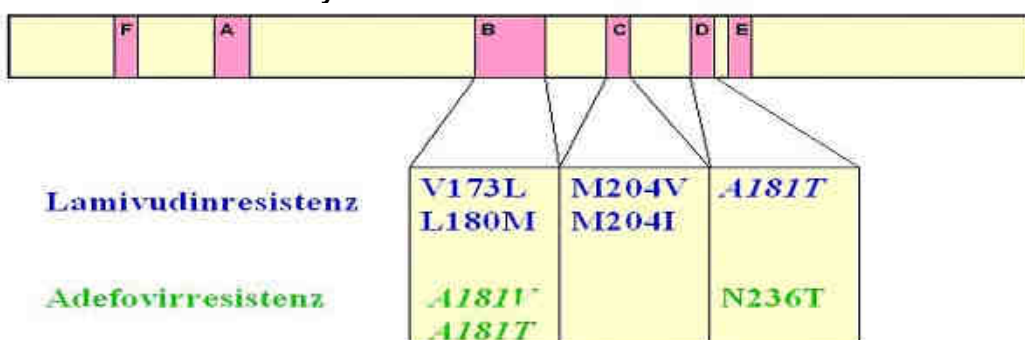


Abb. 1.10 Mutationen innerhalb der RT-Domäne der HBV-Polymerase, die nachweisbar oder sehr wahrscheinlich Resistenz gegen Adefovir bzw. Lamivudin verursachen oder in Kombination mit Resistenzmutationen auftreten. Bei V173L und L180M handelt es sich um kompensatorische Mutationen, die alleine keine Resistenz bedingen. Anm.: es sind lediglich die Mutationen angegeben, deren Bedeutung bezüglich Resistenzvermittlung unstrittig ist. Die Rolle vieler weiterer Mutationen, die in dieser Abbildung nicht erscheinen, wird noch diskutiert oder untersucht.

Der lückenlose Rückschluss von einer Mutation auf eine dadurch verursachte Resistenz ist häufig schwierig. Veränderungen im viralen Genom fallen zunächst durch HBV-Sequenzanalysen auf, die aus dem Serum von Patienten mit chronischer Hepatitis B z.B. wegen eines Anstieg der Virämie durchgeführt wurden. Treten bestimmte HBV-Genom-Mutationen bei Patienten mit Therapieversagen besonders häufig auf, werden sie mit Resistenzvermittlung in Zusammenhang gebracht. Der entgeltliche Nachweis darüber, ob eine Mutation Resistenz verursacht, kann nur durch *in vitro* Untersuchungen erbracht werden. Dabei erfolgt die Phänotypisierung der gefundenen Mutation. Da es sich dabei um ein relativ aufwändiges Verfahren handelt und in den HBV-Genomen infizierter Patienten meistens multiple Mutationen vorhanden sind, kann in der Regel nicht jede Mutation phänotypisch *in vitro* untersucht werden. Erschwerend kommt hinzu, dass es bei HBV auch ohne antiviralen Selektionsdruck zu Spontanmutationen kommt, so dass bei weitem nicht jede Mutation, die unter Therapie auftritt, zur Resistenz führt.

Als 2002 Adefovir dipivoxil als zweites Nukleosidanalogen für die Therapie der chronischen Hepatitis B zugelassen wurde, verbreiteten erste Studien Hoffnung unter Ärzten und Patienten. Im Gegensatz zur Therapie mit Lamivudin, die eine rasche Resistenzentwicklung mit sich brachte (je nach Studie Therapieversagen bei 15 % der untersuchten Patienten nach einem Jahr, bei bis zu 70% nach vier bis fünf Jahren [73] - gemessen an Anstieg der ALAT-Serumspiegel und Sequenzanalyse), schienen antivirale Resistenzen kein Problem der Adefovir-Therapie darzustellen. Des Weiteren wurde schnell bekannt, dass Adefovir auch bei Lamivudin-resistenten HBV-Populationen wirksam war. Einige Studien berichten, dass nach 48 [74,75], und sogar nach 144 Wochen [76] antiviraler Therapie mit Adefovir noch keine resistenzvermittelnden HBV-Mutationen innerhalb des Patientenkollektivs nachweisbar waren, andere Studien geben Resistenzraten zwischen 1,6% (Beobachtungszeitraum 96 Wochen) und 18% (Beobachtungszeitraum 48 Wochen) an [77,78,79,80].

Die erste Mutation, die mit viraler Resistenz gegen Adefovir in Zusammenhang gebracht wurde, war ein Asparagin-zu-Threonin-Austausch an Position 236 der RT-Domäne der viralen Polymerase (N236T) [81]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Adefovir an eine durch diese Mutation veränderte RT-Domäne – verglichen mit dem Wildtyp und der YI/VDD-Variante – drastisch vermindert ist [82]. Ebenso wird die Mutation rtA181T als Ursache von Adefovirresistenz diskutiert [83]; und auch die Wirksamkeit von Lamivudin scheint durch diese Mutation eingeschränkt zu werden [84].

## **Evolution und Phylogenie von Hepatitis B Viren im Verlauf der Infektion**

Der Begriff Phylogenie beschreibt die Evolutionsgeschichte einer Art und die Entwicklung verschiedener Subgruppen innerhalb einer Spezies. Phylogenetische Analysen kommen in allen Bereichen der Biologie zur Anwendung, z.B. in der Populationsdynamik oder der Entwicklung von Stammbäumen einer Spezies. Im Gegensatz zu den meisten Organismen entwickeln sich virale Evolutionsprozesse verhältnismäßig rasant. Durch die hohe Mutationsrate viraler Genome sowie eine äußerst effiziente Virusreplikation ist z.B. die sogenannte Evolutionszeit von Viren bis zu einer Million mal kürzer als bei Säugetieren.

Die Erforschung der viralen Evolution innerhalb eines Wirts folgt nicht allein einem akademischen Anspruch. Anhand von phylogenetischen Analysen lassen sich u.a. Infektionsketten für forensische Fragestellungen konstruieren [86,87], ebenso kann die Entwicklung einer Viruspopulation Rückschlüsse auf Prognose und Krankheitsverlauf zulassen [88,89]. Die Analyse der viralen Evolution kann Aufschluß über Therapieerfolg und -versagen geben, und kann helfen, individuelle Virus-Wirts-Beziehungen besser zu verstehen [90,91]. Evolutionsprozesse von Viren wurden bisher am Beispiel von HIV hinreichend untersucht, auf dem Feld der HBV-Forschung liegen bislang nur wenig Erkenntnisse vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass einzelne Bereiche des HBV-Genomes eine höhere Mutationsrate aufwiesen als andere, dabei war die Core-Region am stärksten betroffen, am wenigsten das Gen der Polymerase [92]. Eine Erhöhung des Selektionsdruckes, wie z.B. durch eine gesteigerte Immunantwort, korrelierte mit einer höheren Mutationsrate [93]. In Abwesenheit signifikanter Selektionsdrücke (keine antivirale Therapie, chronische Infektion, HBeAg negativ) erwies sich das HBV-Genom als verhältnismäßig stabil [94]. Um die intraindividuelle Entwicklung von Hepatitis B Viren zu untersuchen, muss eine Patientenkohorte longitudinal begleitet werden. Die klinische Relevanz der Ergebnisse wird dabei durch die Auswahl dieser Patientenkohorte bestimmt (unbehandelte vs. antiviral behandelte Patienten; Vergleich von Virämie, HBsAg, hepatischen Entzündungszeichen u.ä.). Die Auswertung der experimentell gewonnenen Daten erfolgt in der Regel anhand von – in der Molekulargenetik etablierten – mathematischen Modellen.

Es existieren eine Vielzahl an statistischen Methoden, um virale Evolution zu untersuchen. Weit verbreitet ist der phylogenetische Baum. Er verdeutlicht die phylogenetischen, d.h. evolutionären Beziehungen zwischen verschiedenen Gruppen einer Einheit.

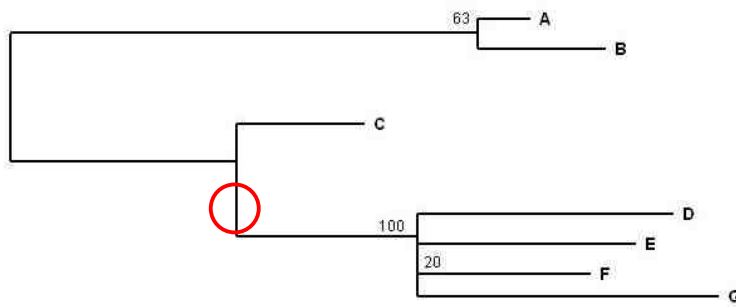


Abb. 1.11 Modell eines phylogenetischen Baumes  
 Roter Kreis: virtueller, gemeinsamer Vorfahre der Gruppen C und D/E/F/G

Jeder Knotenpunkt symbolisiert dabei einen gemeinsamen Vorfahren, die Länge der Strecken des Baumes entspricht der Anzahl der Mutationen, um die sich die Gruppen von ihrem Vorfahren entfernt haben. Die Zahlen an den Aufgabelungen des Baumes geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der das angegebene Verhältnis der folgenden Äste zueinander der Realität entspricht. Wahrscheinlichkeiten über 70% gelten dabei als statistisch signifikant. Phylogenetische Bäume können anhand von verschiedenen mathematischen Algorithmen errechnet werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Bäume wurden nach dem Neighbor-Joining-Verfahren erstellt.

Eine weitere Möglichkeit der phylogenetischen Analyse bildet die Verwendung von Netzwerken. Ein Netzwerk gibt in erster Linie Auskunft über Abstammung und Entwicklung verschiedener Gruppen, und ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn sich diese Gruppen nicht unabhängig bzw. isoliert voneinander entwickelt haben. Anhand eines Netzwerkes können Vorfahrens- und Nachkommens-Populationen ermittelt werden.

Die Evolution viraler Population innerhalb eines Wirts wird von vielen Faktoren beeinflusst. Die Individuelle Immunantwort auf die Infektion – und bei HBV die Umstrukturierungsprozesse der infizierten Leber – wirken sich auf die virale Replikation aus, ebenso wie die antivirale Therapie. Um auf Genome einwirkende Selektionsdrücke zu ermitteln, entwickelten Nei und Gojobori 1986 die Methode der stummen und nicht-stummen Substitutionen (*synonymous and non-synonymous substitutions*) [95]. Stumm ist dabei eine Nukleotidsubstitution, die sich nicht auf Aminosäureebene auswirkt, während eine nicht-stumme Substitution zu einem Aminosäureaustausch führt. Die Theorie besagt, dass in viralen Genomen in Abwesenheit eines äußeren Selektionsdruckes stumme Mutationen überwiegen, eine Zunahme der nicht-stummen Mutationen hingegen für die Existenz eines auf die Viren einwirkenden Selektionsdruckes spricht. Wie bei jeder statistischen Annäherung an ein biologischen Phänomen gibt diese Methode lediglich eine Wahrscheinlichkeit ohne Anspruch auf Unfehlbarkeit an [96], stellt aber dennoch ein erprobtes System zur Abschätzung von Tendenzen dar.

## II. MATERIAL UND METHODEN

---

---

### Material

---

Die verwendeten Reagenzien/Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad pro analysi. Alle Puffer, Lösungen, Medien u.ä. wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Chemikalien wurden – sofern nicht anders angegeben – von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) bezogen. Materialien und Reagenzien für Zellkultursysteme stammten, wenn keine anderen Hersteller genannt wurden, von den Firmen Gibco BRL (USA), Sigma (Mannheim), Biochrom (Berlin), Greiner (Solingen) und Sarstedt (Nümbrecht).

Die in den Zellexperimenten verwendeten Medikamente Adefovir, Tenofovir und Lamivudin wurden bei Moravek Biochemicals (USA) erworben.

Alle DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm MacVector™ 7.0 (MacVector Inc., USA) *in silico* analysiert, verglichen und translatiert.

### Bakterienmedien

---

LB-Nährmedium		15 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Glukose 6 g/l NaCl
LB-Nährmedium mit Ampicillin	+	100µg/ml Ampicillin
Bakterien-Agarplatte		1,5 % Bacto-Agar 15 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Glukose 6 g/l NaCl
Bakterien-Agarplatte mit Ampicillin	+	100µg/ml Ampicillin

## Zellkultur

---

Standardmedium	DMEM-Medium, ergänzt durch: 10% Fetales Kälberserum, hitzeinaktiv. 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1 mM Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
PBS pH 7,4 (10-fach konzent.)	140 mM NaCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mM KCl
Trypsin	0,25% Trypsin 1 mM EDTA
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim

## Weitere Puffer und Lösungen

---

DNA-Proben-Ladepuffer (6-fach konzent.)	30 % Glycerin 60 mM EDTA 6 mM Tris, pH 7
SDS-Elektrodenpuffer	250 mM Tris 19 mM Glyzin 0,35 mM SDS
SSC (20-fach konzent.)	3 M NaCl 300 mM C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O
TAE	800 mM Tris 40 mM EDTA
TBS pH 7,4 (10-fach konzent.)	10 mM Tris 100 mM NaCl



TBST pH 7,4	10 mM Tris 100 mM NaCl 0,1 % Tween® 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,1 1 mM EDTA

## Enzyme

---

Taq/Tgo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
BD TITANUM™ Taq DNA polymerase	BD Biosciences, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
BigDye sequencing reagent	Applied Biosystems, USA
DNAse I	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Alle Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/Main

## Oligonukleotide

---

Alle Oligonukleotide – bis auf M13+ und M13- (Invitrogen, USA) – wurden bei MWG, Ebersberg bestellt.

### Analytisch / DNA-Amplifikation

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
P1	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT <u>TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA</u>
P2	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA <u>AAA AGT TGC ATG GTG CTG G</u>
P3	CTC GCT CGC CCA AAT <u>TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA</u>
P4	CTG GTT CGG CCC <u>AAA AAG TTG CAT GGT GCT GG</u>

Die direkt am HBV-Genom hybridisierenden Anteile sind unterstrichen, bei der restlichen Sequenz handelt es sich um heterologe Restriktionsstellen für die Enzyme Hind III, Sap I und Sst I, die eine spätere Klonierung des Amplifikates erleichtern sollen. Sequenz s. [97].

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
67+	CTC CAG TTC AGG AAC AGT AAA CCC
1121-	TTA CAC AGA AAG GCC TTG

## DNA-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
P <sub>S</sub> 1	TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CG
P <sub>S</sub> 2	TGT TTG GCT TTC AGT TAT ATG GAT GAT
P <sub>S</sub> 3	TCT GCC GAT CCG ATC CAT ACT GCG GAA CTC CTA
P <sub>S</sub> 6	GCC TCA TTT TGT GGG TCA CCA TAT TCT TGG G
P <sub>S</sub> 2-	AGA CAA AAG AAA ATT GGT AA
P <sub>S</sub> 4-	TGG GGA GCT CCG GTG GTC TCC ATG CGA CGT GC
P <sub>S</sub> 6-	GAT TGA GCT CAG GTA CAG TAG AAG AAT AAA GCC C
P <sub>S</sub> 7-	TTG GGA TTG AAG TCC CAA TCT GGA
P <sub>S</sub> SP1	GGT ATG TTG CCC GTT TGT
P <sub>S</sub> SP2	GTA ATT GGA AGT TGG GGT AC
P <sub>S</sub> SP1-	TGT TTA GCT TGT ATA CAT GCA TA
P <sub>S</sub> SP2-	CTG AAC AAA TGG CAC TAG TAA A
M13+	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-	CAG GAA ACA GCT ATG AC

## Kits

TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kits	Invitrogen, USA
GeneClean <sup>®</sup> Gel Isolation Kit	Q-Biogene, USA
Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Readyprime II Random Prime Labeling System	Amersham, Heidelberg

## Plasmide

ptHBV1.3	enthält ein HBV-Genom 1,3-facher Länge (Genotyp D, Referenztyp, NCBI Genbank Nr. V01460), Vektor pUC13. (H.Schaller, Heidelberg)
pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	zur Klonierung von HBV-Genomen aus Patientenserum. Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz. (Invitrogen, USA)

## Bakterien

---

Top 10 F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   
 $\Delta lacX74$  *recA1* *araD139*  $\Delta(araleu)$  7697 *galU* *galK*  
*rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*  
(Invitrogen, USA)

## Zellen

---

C3A humane Hepatoma-Zelllinie, Subklon der Zelllinie  
HepG2

## Geräte

---

Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman, USA
Hochgeschwindigkeitszentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
RoboCycler Gradient 40 und 96	Stratagene, Niederlande
Photometer Ultraspec 3000 pro	Pharmacia, Freiburg
Gel Dokumentationssystem	Decon, Hohengandern
Phosphoimager Fujix Bas	Raytest, Straubenhardt
Fluor-S multi-imager	Bio-Rad, USA
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker	Stratagene, Niederlande
Zellkultur-Inkubatorschrank	Thermo, Berlin
Bakterien-Schüttler/Inkubator	New Brunswick Scientific, USA
pH-Meter	Inolab, Weilheim
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	Thermo, Berlin
Wasserbad	Milian, Frankreich

## Methoden

---

### Einverständniserklärung der Patienten

Die Serumproben stammten von Patienten des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die dort im Rahmen einer Adefovirstudie betreut wurden. Alle Patienten hatten ihr Einverständnis gegeben, dass ihre Blutproben zu Forschungszwecken verwendet werden durften.

### Blutentnahmen und Patientenkollektiv

Alle Patienten litten an einer chronischen Hepatitis B und wurden regelmäßig auf HBsAg, HBeAg und HBV-Viruslast untersucht. In dem für diese Arbeit relevanten Beobachtungszeitraum (2002/03 - 2005) wurden alle Patienten mit Adefovir therapiert, keiner der Betroffenen hatte dieses Medikament jemals vorher erhalten. Die meisten Patienten waren bereits mit Lamivudin vorbehandelt und wiesen entsprechende Resistenzen auf, für einige stellte die Adefovirtherapie die erste Behandlung mit einem Nukleotid/sidanalogon dar.

Die in dieser Arbeit untersuchten Virusgenome wurden aus Patienten gewonnen, bei denen die Adefovirtherapie nicht oder nur mäßig erfolgreich verlief. Dabei galten folgende Definitionen:

**Therapieerfolg:** Aus dem Serum des Patienten ließ sich während der Behandlung mit Adefovir keine Virus-DNA amplifizieren. Der HBV-DNA-Titer lag unter der Nachweisgrenze von 100 GE/ml (Diagnostiklabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf).

**Therapieversagen:** Der HBV-DNA-Titer lag im Verlauf der Therapie zu keinem Zeitpunkt unter der Nachweisgrenze.

**Partieller Therapieerfolg:** Der HBV-DNA-Titer des Patienten fiel nach ADF-Therapiebeginn zwar um mehrere Logstufen ab, (z.B. von  $10^8$  auf  $10^3$  GE/ml), konnte jedoch nicht unter die Nachweisgrenze gesenkt werden.

„Relapse“:

Der HBV-DNA-Titer des Patienten lag über einen längeren Zeitraum unter der Nachweisgrenze, stieg schließlich jedoch wieder über die Nachweisgrenze an.

Patient	HBV-Genotyp	Geschlecht	Alter	HBeAg	Vorhergehende Behandlung	Adefovir-Therapie
1	A	m	37	pos	Lamivudin	nicht erfolgreich
2	D	m	17	pos	Lamivudin	partiell erfolgreich
3	D	m	35	pos	Lamivudin	<i>relapse</i>
4	A	m	39	pos	Lamivudin	nicht erfolgreich
5	D	m	23	pos	keine	nicht erfolgreich
6	A	m	60	pos	Lamivudin	nicht erfolgreich
7	D	m	38	<i>neg</i>	Lamivudin	nicht erfolgreich
8	A	f	45	pos	Lamivudin	partiell erfolgreich
9	A	m	41	pos	Lamivudin	partiell erfolgreich
10	D	m	54	pos	Lamivudin	partiell erfolgreich
11	D	m	37	<i>neg</i>	keine	<i>relapse</i>
12	D	m	53	pos	keine	partiell erfolgreich
13	D	m	44	pos	keine	nicht erfolgreich
14	G/A	m	38	pos	Lamivudin	nicht erfolgreich

Tab. 2.1 Übersicht über die 14 Patienten mit chronischer Hepatitis B, aus deren Seren die untersuchten HBV-Genome gewonnen wurden.

Die Serumproben, aus denen die HBV-DNA extrahiert, kloniert und sequenziert wurde, wurden einmal zu Beginn und noch einmal nach mehreren Monaten Adefovirtherapie gewonnen. Dieser Zeitraum erstreckte sich im Durchschnitt über 22 Monate (17 - 31 Monate). Von Beginn der Adefovirtherapie an bis zur Entnahme der zweiten Serumprobe wurde jede weitere antivirale Behandlung ausgesetzt. Bei den meisten Patienten wurden HBV DNA-Titer und HBsAg über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg regelmäßig kontrolliert.

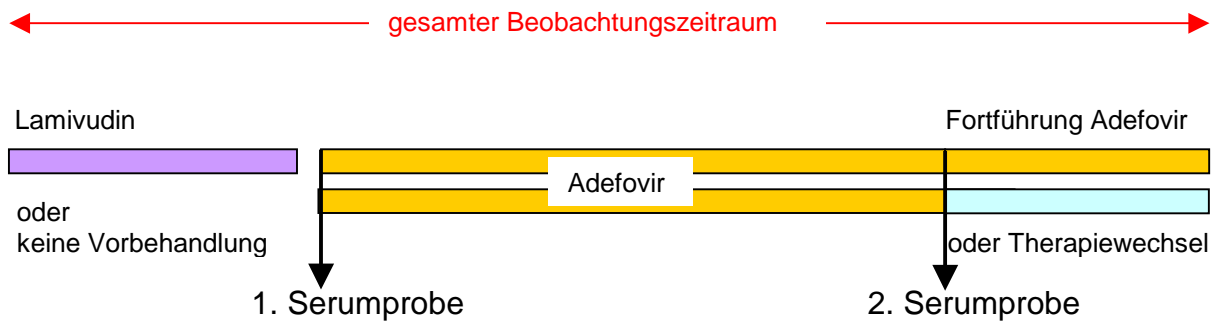


Abb. 2.1 Zeitlicher Ablauf von Therapie und Serumgewinnung über den Beobachtungszeitraum. Patienten erhielten entweder Lamivudin oder waren bisher noch nicht behandelt worden. Vor Beginn der Adefovirgabe waren alle vorausgehenden Therapien abgesetzt worden. Alle Patienten bekamen Adefovir zum ersten Mal. Analysiert wurde HBV-DNA, die zu Anfang und nach mehreren Monaten Adefovirtherapie aus Patientenseren gewonnen wurde. Bis zum Zeitpunkt der 2. Serumabnahme erhielten die Patienten außer Adefovir kein anderes antivirales Medikament. Nach diesem Zeitpunkt wurde die Therapie – je nach Patient – mit Adefovir alleine fortgeführt, um ein weiteres Medikament ergänzt, oder auf ein anderes Nukleosidanalogon umgestellt.

## DNA-Extraktion aus Serumproben

Die Analyse der HBV-DNA erfolgte retrospektiv, d.h. erst nachdem beide Serumproben vorlagen. Direkt nach den Blutentnahmen wurden Erythrozyten und Serum getrennt und bis zum weiteren Gebrauch bei minus 20°C eingefroren.

Die HBV DNA aus den Seren wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene mit Hilfe des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Mannheim) nach dem Herstellerprotokoll extrahiert.

## Amplifikation von HBV-Genomen

### Amplifikation des gesamten HBV-Genoms

Für die Amplifikation des gesamten HBV-Genomes wurde die extrahierte DNA in eine „full-length“ PCR eingesetzt (Günther et al., 1995 [97]). Die Besonderheit dieser PCR lag in der Lokalisation der Primer-Bindungsstellen, die es ermöglichte, das gesamte Virusgenom zu amplifizieren. Die Amplifikation des partiell doppelsträngigen HBV-Genoms stellte eine Herausforderung dar, weil der HBV-Minusstrang an einer Stelle unterbrochen ist (*nick*-Region) und der DNA-Plusstrang keine volle Genomlänge besitzt

(*gap*-Region). Die PCR-Elongation verläuft an der *nick* Region sehr ineffizient, so dass die vollständige Amplifikation des Genomes erschwert ist. Bei der *full-length* PCR lagen die Primerbindungsstellen in der *nick*-Region und waren so angeordnet, dass die Synthese des komplementären DNA-Minusstranges über diesen Bereich hinweg vermieden wurde.

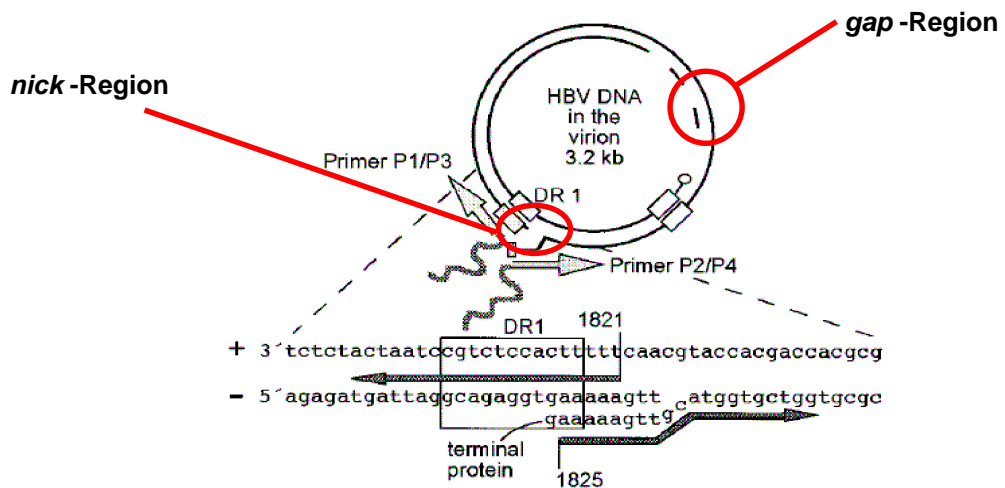


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen der „full-length“-PCR in der *nick*-Region des HBV-Genoms (aus Günther et al. 1995 [97], modifiziert)

Um die Anzahl der artefiziellen Mutationen im Genom möglichst gering zu halten, wurde für alle PCRs eine Polymerase mit „*proof-reading*“ Aktivität eingesetzt (Taq/Tgo DNA polymerase, Expand High Fidelity PCR System von Roche sowie BD TITANUM™ Taq DNA polymerase, BD Advantage™ von BD Biosciences). Die vom Hersteller angegebenen Fehlerraten lagen bei  $4,8 \times 10^{-6}$  (Roche) und  $2,5 \times 10^{-4}$  Basenpaaren (BD Biosciences). Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde bei jedem PCR-Durchlauf eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle von DNA ein äquivalente Volumen an ddH<sub>2</sub>O enthielt. Als Mengenstandard dienten Verdünnungen eines HBV-Referenzisolats mit  $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  Genomäquivalenten.

Um das gesamte HBV-Genom zu amplifizieren, wurden die Primerpaare P1/P2 und P3/P4 benutzt, die an der *nick*-Region in gegensätzlicher Richtung hybridisierten.

Die Proben wurden jeweils einmal mit den Primerpaar P1/P2 sowie mit dem Primerpaar P3/P4 in die PCR eingesetzt, da je nach Genom die Amplifikation mit dem einen oder dem anderen Primerpaar effizienter erfolgte.

Der Reaktionsansatz für 50 µl wurde wie folgt vorbereitet:

5,0 µl 10 x PCR Puffer  
1,0 µl dNTPs (je 12,5 mM)  
0,5 µl P2 (10 pmol)  
0,5 µl P1 (10 pmol)  
1,0 µl Polymerase  
37,0 µl ddH<sub>2</sub>O  
5,0 µl Probe

Die Reaktion verlief über insgesamt 40 Zyklen nach folgendem Programm, nach 10 Zyklen wurde die Elongationsdauer auf 5:00 min erhöht.

1. Denaturierung	94°C	40 sec
2. Hybridisierung	60°C	90 sec
3. Elongation	68°C	180 sec

#### Verfahren bei Proben mit niedrigen HBV-Titern

Die Sensitivitätsgrenze der „full length“-PCR lag bei  $10^3$  Genomäquivalenten (*genome equivalent*, GE). Für die erfolgreiche Weiterverarbeitung der amplifizierten DNA (Eluation, Ligation, Klonierung) musste das in die PCR eingesetzte Patientenserum einen HBV-DNA-Titer von mindestens  $3 \times 10^5$  GE/ml aufweisen. Zur Amplifikation von HBV-DNA aus dem Serum von Patienten mit einem Virustiter von unter  $3 \times 10^5$  GE/ml wurden deshalb andere Primer eingesetzt. Dabei wurde ein ca. 1700 bp langes subgenomisches Fragment aus dem Polymerase-ORF des Virus amplifiziert, das die Sequenz der RT-Domäne (Reverse Transkriptase) vollständig einschloss. Dieses Amplifikat war deutlich kürzer als das vollständige HBV-Genom (ca. 3200 bp), die Sensitivität dieser PCR mit bis zu  $10^2$  GE/ml dementsprechend höher als die der „full length“-PCR. Für die Amplifikation des 1700 bp Fragments wurden die Primer 67+ und P2 verwendet.



Der Reaktionsansatz für 50 µl wurde wie folgt vorbereitet:

5,0 µl 10 x PCR Puffer  
0,5 µl dNTPs (je 12,5 mM)  
2,0 µl P2 (10 pmol)  
0,5 µl 67+ (10 pmol)  
0,5 µl Polymerase  
35,0 µl ddH<sub>2</sub>O  
5,0 µl Probe

Die Reaktion verlief insgesamt über 30 Zyklen nach folgendem Temperaturprogramm, nach 10 Zyklen wurde die Elongationsdauer auf 3,5 min erhöht. Zum Schluss schloß sich ein zusätzlicher Elongationsschritt für 10 min an.

1. Denaturierung:	94°C	40 sec
2. Hybridisierung	60°C	90 sec
3. Elongation	70°C	120 sec

Für die Amplifikation von HBV-Genomen aus Patientenseren mit einem Virustiter von unter  $3 \times 10^5$  GE/ml standen vier Möglichkeiten zur Auswahl: (a) Einsatz der DNA in eine PCR zur subgenomischen DNA-Amplifikation; (b) Einsatz der DNA in eine „full length“-PCR, 2,5 µl des PCR-Produktes wurden dann unaufgereinigt in einen zweiten *full length* PCR-Durchlauf eingesetzt; (c) Einsatz der DNA in eine „full length“ PCR; 2,5 µl des PCR-Produktes wurden dann unaufgereinigt in die oben beschriebene PCR zur Amplifikation eines subgenomischen Fragments eingesetzt; (d) Einsatz der DNA in eine PCR zur Amplifikation eines subgenomischen Fragments, 2,5 µl des PCR-Produktes konnten dann unaufgereinigt die Reaktion nach gleichem Protokoll ein zweites Mal durchlaufen. Diese Methode kam als ultima ratio zur Anwendung, sie wies die höchste Sensitivität der HBV-Genom-Amplifikation auf.

Die PCR-Amplifikate wurden auf Agarosegele (1%) mit Ethidiumbromid aufgetragen, bei 80 V ca. 45 min lang elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet.

### **Aufreinigung der amplifizierten HBV-DNA aus PCR-Ansätzen**

Je 40 µl PCR Amplifikat wurden zusammen mit einem Größenmarker (1kb DNA-Ladder, Invitrogen, USA ) elektrophoretisch aufgetrennt (1% Agarosegel, mit Ethidiumbromid). Unter UV-Sicht (reduzierte Intensität bei 70%) wurden die Banden kurz mit einem Skalpell

markiert und später entlang der Markierung ausgeschnitten. Das Skapell wurde vorher und zwischen der Entnahme der verschiedenen Banden mit Ethanol gereinigt. Die DNA aus den Gelstücken wurde mittels GeneClean<sup>®</sup> Gel Isolation Kit (Q-Biogene, USA) wie beschrieben eluiert. Dabei bindet die DNA an eine lösliche Silikonmatrix, von der sie sich erst im wässrigen Milieu wieder löst.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen, das dreifache Volumen an Natriumjodid-Lösung sowie 100 µl TBE dazupipettiert. In dieser Lösung wurde das Gelstück bei 55°C unter leichtem Schütteln auf dem Heizblock gelöst.

Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurden 5 µl Glassmilk<sup>®</sup> hinzugefügt. Der gesamte Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, um die Bindung der DNA an die Glassmilk zu ermöglichen. Die Glassmilk wurde pelletiert (20 sec bei 13000 rpm und 4°C), in 1 ml Waschpuffer gewaschen, danach erneut pelletiert und bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, dabei löste sich die DNA von der Matrix. Nachdem die Glassmilk erneut pelletiert wurde (1 min, 13000 rpm, 4°C, Eppendorf 5415R), konnte das DNA-Eluat vorsichtig abgenommen werden.

5 µl des DNA-Eluats wurden auf ein Agarosegel (1%, mit Ethidiumbromid) aufgetragen, bei 80 V ca. 30 min lang elektrophoretisch aufgetrennt und anhand eines 1 kb-Größen- und Mengenmarkers semiquantifiziert.

## **Klonierung der amplifizierten HBV-DNA**

Die Klonierung der HBV-Genome wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen, USA) durchgeführt. Dabei kommt es zur Ligation von DNA und Vektor (pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>). Dieser Vektor liegt linearisiert vor und verfügt über 3'-T-Überhänge, an die eine Topoisomerase kovalent gebunden ist. Durch sie wird, sofern vorhanden, DNA mit überlappenden Enden (A-Überhängen) in den Vektor einbaut und ligiert.

Da der mit pfu-Polymerase amplifizierten HBV-DNA die zur Ligation benötigten 3'-A-Überhänge fehlten, mussten diese durch die terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase nachträglich angehängt werden. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach Ablauf der *full length* PCR mit 1 µl Taq-Polymerase (Invitrogen, USA) 10 min lang bei 72°C inkubiert.

Für die Ligation wurde folgender Ansatz bereitet:

1,0 µl	Salzlösung (TOPO TA Salt Solution: 1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )
1,0 µl	pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> Vektor
0,5-4,0 µl	DNA-Eluat (je nach Konzentration)
ad 6,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Ligationsansätze wurden 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### **Transformation der Plasmide in kompetente E. coli (TOP 10)**

100 µl chemisch kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und 20 min auf Eis inkubiert, um die Bindung der Plasmide an die Zellmembran zu ermöglichen. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte über die Membranporen, nachdem die Bakterien für 45 sek einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt worden waren. Um die Expression des Resistenzgenes zu fördern, wurden die Bakterien zunächst mit 900 µl LB-Medium versetzt und bei 37°C 30 min schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen 3 min lang bei 3000 rpm und 4°C pelletiert und überschüssiges Medium entfernt. Die Bakterien wurden auf 10 cm-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und ca. 16 h lang bei 37°C inkubiert.

Nach Ende der Inkubation wurden einzelne Zellkolonien (*colony forming unit*, CFU), jeweils aus einem Klon bestehend, mit einer sterilen Pipettenspitze angestochen und damit je ein Reagenzglas mit 3 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Unter Schütteln inkubierten die Bakterien nun wiederum bei 37°C für ca. 16 h.

### **DNA-Extraktion aus Bakterien / alkalische Lyse**

Die DNA wurde mit Hilfe von Reagenzien aus dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus den Zellen extrahiert. Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für die „Mini-Preparation“.

### **Restriktionsverdau der DNA**

Der Klonierungserfolg wurde anhand der Größen von HBV-Insert und Vektor überprüft. Dazu wurde zunächst ein analytischer Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (New England Biolabs, Frankfurt/Main) durchgeführt.

Der Restriktionsverdau fand für 30 min bei 37°C statt und wurde wie folgt angesetzt:

0,5 µl	EcoRI (20000 units/ml)
3,0 µl	EcoRI Puffer
2,0 µl	Plasmid-HBV-DNA-Präparation
ad 30,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Zur Analyse wurden 3,0 µl des Restriktionsansatzes auf ein Agarosegel (1%, mit Ethidiumbromid) aufgetragen, elektrophoretisch bei 90 V für 70 min aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet. Neben jeder Restriktionsprobe wurde zum Vergleich ungeschnittenes Plasmid der gleichen Konzentration aufgetragen. Anhand der Größe der Plasmid-DNA wurden diejenigen Klone herausgesucht, die vollständig amplifizierte HBV-DNA-Inserts trugen.

Um die Reinheit der DNA für die Sequenzierungsreaktion zu erhöhen, wurde die DNA dieser Klone erneut mit Ethanol gefällt. Das Volumen des Eluates wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, mit weiteren 100 µl Ethanol und 10 µl 3M NaAc versetzt und für 10 min bei minus 80°C inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationschritt für 15 min bei 13200 rpm und 4°C und zwei Waschschr itte mit 70% Ethanol bei gleicher Temperatur und Geschwindigkeit für jeweils 5 min. Die DNA wurde 15 min lang im Speed Vac bei 30°C getrocknet und anschließend in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **DNA – Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsmessung der DNA wurde am Spektrometer (Ultraspec 3000 pro) durchgeführt. Die saubere Monovette des Gerätes wurde mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O als Leerprobe geeicht. Die DNA wurde im Verhältnis 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, 150 µl wurden zur Messung in der Monovette eingesetzt.

### **Sequenzierung der HBV-DNA**

Die Sequenzierreaktion konnte in PCR-Maschinen im eigenen Labor durchgeführt werden, für die Auswertung der Reaktion (ABI-Sequenator 3100, Applied Biosystems, USA) mussten die Reaktionsansätze an den Sequenzierservice des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf weitergegeben werden.

Die Sequenzierreaktion verlief insgesamt über 25 Zyklen.

1. Denaturierung	96°C	10 sec
2. Hybridisierung	50°C	5 sec
3. Elongation	60°C	240 sec

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

8,0 µl	2,5 x Sequenzierpuffer
2,0 µl	Primer (10 pmol)
2,5 µl	BigDye Reagenz
400,0 ng	DNA
ad 20,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Das BigDye Reagenz (BigDye-Terminator-Kit 1.1, Applied Biosystems) enthielt eine Polymerase sowie den Nukleotidmix (dNTPs und ddNTPs).

Nach Reaktionsende wurden die Ansätze mit Ethanol gefällt. Aufgrund der Photosensibilität des BigDye Reagenz wurden alle Arbeitsschritte unter minimaler Lichtexposition durchgeführt. Jede Probe wurde in 80 µl NaAc aufgenommen, mit 300 µl Ethanol versetzt und 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 13200 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen, es erfolgte ein einmaliger Waschschrift mit 400 µl 80% Ethanol und die Zentrifugation wie oben. Die DNA wurde 10 min bei 30°C im Speedvac getrocknet. Zur Analyse wurden die Proben an den Sequenzierservice des UKE abgegeben.

### Sequenzierprimer

Die RT-Domäne konnte mit insgesamt 3 Primern vollständig sequenziert werden. Da jedoch HBV-DNA aus verschiedenen Geno- und Serotypen analysiert wurde, zusätzlich auch häufig innerhalb desselben Patienten verschiedene HBV-Subpopulationen vorlagen, wurde ein größeres Repertoire an Primern benötigt. Zunächst gelangten die Standardprimer P<sub>S</sub>1, P<sub>S</sub>2 und P<sub>S</sub>2- zum Einsatz. Wenn ein Primer nicht hybridisierte, wurde anhand einer meist bereits vorliegenden Sequenz eines anderen HBV-Klons desselben Patienten oder eines fremden Klons mit zumindest gleichem Sero- und Genotyp ein Alternativprimer konstruiert. Dazu wurden 20-32 Nukleotide einer möglichst konservierten Region ausgewählt und ein entsprechender Primer entworfen. Die Primer wurden bei MWG (Ebersberg) bestellt.

Insgesamt kamen folgende Primer zum Einsatz: P<sub>S</sub>1, P<sub>S</sub>2, P<sub>S</sub>2-, P<sub>S</sub>4-, P<sub>S</sub>SP1, P<sub>S</sub>SP2, P<sub>S</sub>SP1-, P<sub>S</sub>SP2-. Für die Sequenzierung des gesamten HBV-Genomes wurden zusätzlich die Primer P<sub>S</sub>3, P<sub>S</sub>6, P<sub>S</sub>6-, P<sub>S</sub>7-, M13+ sowie M13- benötigt.

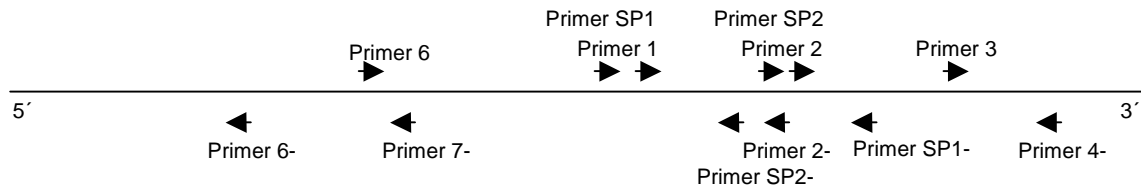


Abb.2.3 Ansatzstellen der verschiedenen Sequenzierprimer auf dem HBV-Genom (nach Galibert et al. 1979 [99])

## Gerichtete Mutagenese

Als HBV-Referenzisolat diente bei allen Mutagenesen das Plasmid ptHBV1.3, bestehend aus dem Vektor pUC13 und einem HBV-Genom 1,3-facher Länge (Genotyp D, NCBI Genbank Nr. V01460, Galibert et al. 1979 [99]).

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass ausschließlich im Leserahmen der Polymerase (P-ORF) ein Aminosäureaustausch generiert wurde und weitere, überlappende ORFs unbeteiligt blieben.

Während der Hybridisierung binden die beiden komplementären Oligonukleotide an die entsprechend komplementäre Sequenz des Plasmids. Dabei besteht an der Position der späteren Mutation ein „*mismatch*“ zwischen Primer und Plasmid-Sequenz. Im Rahmen der Amplifikation entstehen neue DNA-Moleküle mit der gewünschten Nukleotidmutation. Um die in die Reaktion eingesetzte Input-DNA (aus Bakterienplasmiden) von den neu synthetisierten DNA-Strängen zu trennen, macht man sich die Eigenschaft von Bakterien zunutze, ihre DNA zu methylieren. Die neu synthetisierte DNA enthält im Gegensatz dazu keine Methylreste.

Die Restriktionsendonuklease DpnI verdaut selektiv methylierte DNA. Durch einen DpnI-Verdau bleiben nur die neuen DNA-Plasmide mit der gewünschten Mutation übrig, diese können dann wiederum in kompetente Bakterien transformiert werden.

Der Reaktionsansatz für die Mutagenese wurde wie folgt vorbereitet:

5,0 µl	10 x PCR Puffer
1,0 µl	dNTPs (je 12,5 mM)
2,0 µl	Primer ( <i>forward</i> )
2,0 µl	Primer ( <i>reverse</i> )
1,0 µl	Pfu-Polymerase ( <i>proof-reading</i> )
20,0 ng	ptHBV1.3- Plasmid
ad 50,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktion durchlief 16 Zyklen nach folgendem Temperaturprogramm (initiale Denaturierung sowie abschließende Elongation II nur einmal):

1. Initiale Denaturierung	94°C	2:00 min
2. Denaturierung	94°C	0:30 min
3. Hybridisierung	60°C	1:30 min
3. Elongation	68°C	15:00 min
4. Elongation II	68°C	10:00 min

Zur späteren Kontrolle wurde in der Mutagenese-PCR ein Reaktionsansatz, in dem die *proof-reading* Polymerase durch ddH<sub>2</sub>O ersetzt worden war, mitgeführt.

Nach Abschluß der PCR wurden 10 µl der Probe auf ein Agarosegel (1%, mit Ethidiumbromid) aufgetragen und analysiert.

Für den anschließenden Dpn I - Verdau wurde folgender Ansatz bereitet:

10,0 µl	Mutagenese-PCR Produkt
2,0 µl	DpnI Puffer
1,0 µl	DpnI
7,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Der Verdau lief für 2 h bei 37°C, danach wurden 10 µl des Ansatzes in kompetente TOP 10 E.coli transformiert. Dabei konnte anhand folgender transformierter Kontroll-Ansätze der Erfolg der Mutagenese und des DpnI Verdau überprüft werden:

- ptHBV1.3; + Polymerase; + DpnI (HBV-Amplifikat mit gewünschter Mutation)
- ptHBV1.3; Ø Polymerase; + DpnI (Dpn I Verdau – Positivkontrolle)
- ptHBV1.3; Ø Polymerase; Ø DpnI (entspricht Menge an eingesetzter Input-DNA)

Nach einem analytischen Restriktionsverdau (zur Kontrolle der richtigen Größe der Amplifikate) erfolgte die Kontroll-Sequenzierung der neu synthetisierten DNA.

## **Plasmid Maxi Präparation**

Mittels Maxi-Präparation konnten größere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen werden. Dazu wurden 250 ml Ampicillin-LB-Medium mit HBV-transformierten E.coli angeimpft und inkubiert. Für die Plasmid-Extraktion aus den Zellen wurde das Plasmid Maxi Preparation Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

## **Zellkultursysteme und -experimente**

Die Phänotypisierung von HBV-Mutanten erfolgte im Zellkultursystem.

Diese Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einem getrennten Bereich des Labors mit autoklavierten Lösungen und Materialien durchgeführt. Alle Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Das Standardmedium für Zellen war DMEM, mit 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1mM Pyruvat, 10% fetalem Rinderserum (FBS, hitzeinaktiviert bei 56°C), 100µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin. Der Zustand der Zellen wurde jeden Tag unter dem Mikroskop beurteilt.

Um die Sensitivität bestimmter HBV-Varianten gegenüber antiviralen Medikamenten *in vitro* zu testen, wurden C3A-Zelllinien mit mutierten HBV-Genomen transfiziert. Die gewünschte Mutation war durch gerichtete Mutagenese in das Plasmid ptHBV1.3 eingefügt worden. Zur Vergleichskontrolle wurde ein Teil der Zellen mit unverändertem ptHBV1.3 transfiziert, der Referenzsequenz für HBV-Wildtyp Genotyp D. In der Zellkultur wurden die transfizierten Zellen den Nukleosidanaloga ausgesetzt. Anhand von viralen Partikeln im Zellüberstand und replikativen Intermediaten im Zellinneren konnten Rückschlüsse auf die Medikamentenwirksamkeit bei der jeweiligen HBV-Mutante im Vergleich zum HBV-Referenzstamm gezogen werden.

## Transfektion

C3A-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gezüchtet, bis sie nahezu konfluent gewachsen waren. Der Zellrasen wurden mit 0,05% EDTA-Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, die Zellen vereinzelt, und je nach Bedarf mit neuem Medium auf 1:10 oder 1:5 verdünnt. Die Transfektionen wurden in 6-well-Platten durchgeführt. Nach dem



Ausplattieren der Zellsuspension, wurden die Platten 24 h im Inkubator belassen, um das erfolgreiche Absetzen der Zellen zu ermöglichen.

Sobald die Zellen eine Dichte von ca. 60% erreicht hatten, erfolgte die Transfektion. Die Aufnahme der HBV-DNA in die Zellen wurde durch FuGENE 6 (Roche, Mannheim) vermittelt, einem Transfektionsreagenz auf Lipidbasis. Pro *well* wurden 4 µg HBV-DNA transfiziert. Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurde zusätzlich GFP-DNA (*green fluorescent protein*, GFP) beigefügt, die zusammen mit der HBV-DNA in die Zellen aufgenommen wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte so der Prozentsatz der erfolgreich transfizierten Zellen abgeschätzt werden, dieser lag in der Regel zwischen 20-30%. Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4,0 µg	HBV-DNA
0,15 µg	GFP-DNA
10,0 µl	FuGENE 6
190,0 µl	DMEM Medium ohne Zusätze

Der Ansatz inkubierte 15 min bei Raumtemperatur und wurde danach dem auf den Zellen vorliegenden Kulturmedium beigefügt. Nach 24 h erfolgte die DNase-Behandlung der Zellen, um überschüssige Plasmid-DNA im Zellüberstand zu entfernen. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit DNase I (Roche, Mannheim) überschichtet und 2 h im Brutschrank inkubiert. Der DNase-Ansatz bestand aus:

200 µg/ml	DNase I
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
in	DMEM-Medium

Um in jedem *well* die gleiche Anzahl transfizierter Zellen zu kultivieren, wurden die C3A-Kulturen nach der DNase-Behandlung trypsiniert, gemischt und auf 12-*well*-Platten überführt.

### Behandlung der Zellen mit Nukleosidanaloga

Um die Auswirkungen von Adefovir, Tenofovir und Lamivudin auf die Virusreplikation von verschiedenen HBV-Mutanten zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen für 6 Tage mit den entsprechenden Nukleosid/tidanaloga inkubiert. Danach erfolgte die Ernte der Zellen. Mittels PCR konnte HBV-DNA aus viralen Partikeln im Zellüberstand bestimmt

werden. Intrazelluläre replikative Intermediate wurden durch einen Southern Blot nachgewiesen.

Jede HBV-Mutante wurde mit aufsteigenden Konzentrationen an Adefovir, Tenofovir (0,5 / 1,0 / 3,0 / 5,0 / 10,0 µM) und Lamivudin (0,1 / 0,35 / 1,0 / 3,0 µM) behandelt, ein *well* blieb jeweils frei von Medikamenten. Da Lamivudin in der Regel auch bei Vorliegen von ADF- oder TNF-Resistenzmutationen wirksam blieb, diente es in dieser Versuchsanordnung als Kontrolle.

Die benötigten Mengen an DMEM-Medium wurden im Voraus mit den entsprechenden Medikamenten versetzt, um Konzentrationsschwankungen zu vermeiden. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte täglich.

### **Ernte der Zellüberstände**

Nach 6 Tagen Behandlung wurden die Zellüberstände (je 1 ml) gewonnen und für 5 min bei 6000 rpm und 4°C von freien Zellen und Zelltrümmern geklärt. In den Zellüberstand sezernierte Virionen und subvirale Partikel wurden dadurch nicht beeinträchtigt. Um die virale DNA aus den Virionen freizusetzen, wurde ein Proteinase K-Verdau mit 30 µg Enzym durchgeführt. Der Verdau lief 2 h bei 56°C, danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzung der Proben für 10 min auf 95°C.

Die DNA wurde mittels PCR semi-quantifiziert. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

5,0 µl	10 x PCR Puffer
0,5 µl	dNTP-Mix (je 12,5 mM)
2,0 µl	Primer 67+ (10 pmol)
2,0 µl	Primer 1121- (10 pmol)
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase
5,0 µl	Probe
ad 50,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktion lief insgesamt über 30 Zyklen nach folgendem Programm. Nach 10 Zyklen wurde die Dauer der Elongation auf 3:30 min erhöht, im letzten Zyklus betrug sie 10 min.

1. Denaturierung	94°C	40 sec
2. Hybridisierung	60°C	90 sec
3. Elongation	70°C	120 sec

## Ernte der Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS überschichtet und gewaschen, anschließend mit 200 µl NP-40 Lysepuffer pro *well* gelöst und in Reaktionsgefäße überführt.

NP-Lösepuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	1 mM	EDTA 0,5M
	1 %	NP-40
	in	ddH <sub>2</sub> O

Die Zellsuspension wurde bei 6000 rpm und 4°C für 10 min von Zelltrümmern geklärt. Um die zellassoziierte Input-DNA aus der Transfektion zu eliminieren, wurde ein DNase-Verdau mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 µg/ml DNase I für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 20 µl EDTA 0,5 M gestoppt. Anschließend wurde die virale DNA durch einen Proteinase K-Verdau freigesetzt.

## Phenol-Chlorophorm Extraktion

Die aufgereinigte Zellsuspension wurde mit 1 ml Phenol (Biomol, Hamburg) gemischt. Dabei verblieb die DNA in der wässrigen Phase, die restlichen Proteine sammelten sich in der Phenol-Phase. Durch kurze Zentrifugation bei Raumtemperatur konnten beide Phase voneinander getrennt werden. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und mit 1 ml Chloroform (J.T.Baker, Griesheim) versetzt, um Reste des Phenols zu entfernen. Nach kurzer Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase erneut abgenommen. Es folgte ein Fällungsschritt mit 1,2 ml eiskaltem Ethanol und 60 µl 3M NaAc. Der Ansatz inkubierte 1 h bei -80°C, danach wurde die DNA für 1h bei 13200 rpm und 4°C pelletiert. Restliche Flüssigkeit wurde im Speedvac (15 min, 30°C) verdunstet, die DNA anschließend in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

## Southern Blot

Replikative HBV-Intermediate aus den transfizierten Zellen wurden mittels eines Southern Blots detektiert. Bei diesem Verfahren wird elektrophoretisch aufgetrennte, virale DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und kann dadurch spezifisch nachgewiesen werden. Dafür wurden 10 µl der extrahierten DNA-Intermediate auf einem 1% „*low-melt*“ Agarosegel aufgetragen. DNA-Mengenstandards von 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> und 10<sup>8</sup> GE ermöglichten eine spätere Quantifizierung der Proben. Nach der elektrophoretischen Auftrennung

wurde das Gel kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 30 min in 0,2 M HCL inkubiert, um die DNA zu depurinieren. Anschließend folgte die Denaturierung der DNA für 45 min in der dafür vorgesehen Denaturierungslösung. Nach einem kurzen Waschschrift in ddH<sub>2</sub>O, wurde das Gel für 45 min neutralisiert. Auch diese Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgewaschen.

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl	
	0,5 M NaOH	pH 14,0
Neutralisierungslösung	1,0 M Tris-HCl	
	1,5 M NaCl	pH 7,5

Die DNA aus dem Agarosegel wurde über Nacht mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond N; Amersham, Freiburg) übertragen.

Nach Beendigung des Blots wurde die Membran an der Luft getrocknet. Die Fixierung der DNA erfolgte durch UV-Bestrahlung der Membran im Stratalinker (Stratagene, Niederlande).

Um die unspezifische Bindung der radioaktiven Sonde an die Membran zu reduzieren, wurde diese zunächst prähybridisiert. Dazu wurde die Membran in einen hohen Hybridisierungskolben geschoben und mit 10 ml PreHyb-Lösung (BD Biosciences, Heidelberg) zwei Stunden lang bei 65°C inkubiert.

### Herstellung einer radioaktiven Sonde

Für die Herstellung der radioaktiven Sonde war ein der zu detektierenden DNA quasi homologes Äquivalent nötig, dazu diente in diesem Fall das Plasmid p<sub>HBV</sub>1.3. Durch einen Restriktionsverdau mit Nco I wurde das gesamte HBV-Genom aus dem Vektor freigesetzt und konnte für die Herstellung der Sonde genutzt werden.

50 ng der HBV-DNA aus dem Vektor wurden auf ein Endvolumen von 45 µl mit TE-Puffer verdünnt.

TE Puffer	10 mM Tris-HCl	pH 8,1
	1 mM EDTA	

Die DNA wurde für 5 min bei 99°C denaturiert und unmittelbar danach auf Eis gestellt, um eine Renaturierung des Doppelstranges zu verhindern.

Nach der Denaturierung wurde die HBV-DNA in ein Readyprime Tube (Readyprime II Random Prime Labeling System, Amersham, Heidelberg) überführt, in dem eine DNA-Polymerase und dNTPs vorlagen. Nach Zugabe von 5 µl des radioaktiven Nukleotids (<sup>32</sup>P-dCTP) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit fand die Synthese des komplementären, mit <sup>32</sup>P-dCTP markierten DNA-Stranges statt. Die Reaktion wurde anschließend mit 5 µl 0,2 M EDTA beendet.

Um überschüssige Nukleotide aus dem Reaktionsmix zu entfernen, wurde der Ansatz 2 min bei 3000 rpm durch einen Filter zentrifugiert. Die Aktivität der Sonde wurde mittels eines Szintillationszählers überprüft. Anschließend wurden 100 µl DNA aus Kälberthymus zugefügt, dadurch konnten unspezifische Bindungen der Sonde an die Nylonmembran reduziert werden. Zum Schluss wurden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen denaturiert (s.o).

### Hybridisierung der Membran und Auswertung der Signale

Die radioaktive Sonde wurde mit 10 ml Pre-Hyb-Lösung gemischt, die Hybridisierung der Membran erfolgte für 10 h bei 65°C. Durch zwei Waschschrte (30 min bei 65°C mit Waschlösung 1; 30 min bei Raumtemperatur mit Waschlösung 2) wurde die ungebundene radioaktive Sonde zusammen mit der Pre-Hyb-Lösung von der Membran entfernt.

Waschlösung 1	10 %	20 x SSC
	1 %	SDS
Waschlösung 2	1 %	20 x SSC
	0,5 %	SDS

Nach Exposition der Phosphoimager-Platte mit der Membran wurden die Signale am Phosphoimager (Fujix Bas, Raytest, Straubenhardt) ausgewertet und mit der zugehörigen Software (AIDA, Raytest) quantifiziert.

### III. ERGEBNISSE

---

Aus den Seren der Blutproben von 14 Patienten mit chronischer Hepatitis B wurde HBV-DNA extrahiert und mittels PCR amplifiziert. Die Sensitivität dieser PCR lag bei  $10^2$  GE/ml, so war auch bei HBV-Proben niedrig virämischer Patienten noch eine Klonierung und Sequenzierung möglich. Durch die hohe Sensitivität der PCR wurde gewährleistet, dass auch minore HBV-Minorpopulationen aus dem Serum der Patienten noch erfolgreich amplifiziert und untersucht werden konnten.

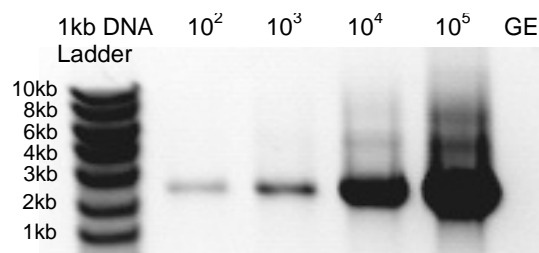


Abb. 3.1 Sensitivität der Full-Length-PCR zur Amplifikation der vollständigen HBV-Genome. Als Mengenstandard diente das Plasmid pTHBV1.3 (HBV Wildtyp, Genotyp D).

Nach durchlaufener Reaktion wurden die PCR-Produkte gereinigt und in Ampicillin-Resistenz vermittelnde <sup>®</sup>4-TOPO <sup>®</sup>-Vektoren kloniert. Diese Plasmide wurden in Top10-Bakterien transformiert. Durch dieses Vorgehen konnte man davon ausgehen, dass jede Kolonie (CFU, *colony forming unit*) aus einem Bakterium hervorging, das ein einzelnes Plasmid aufgenommen hatte. Da jedes Plasmid in der Regel ein HBV-Genomamplifikat enthielt, entsprach die aus einer CFU isolierbare HBV-DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit genau einem Virusgenom-Molekül. Dadurch konnten verschiedene in einem Wirt vorhandene HBV Genome parallel analysiert und verglichen werden. Die Auftrennung und Untersuchung der einzelnen HBV-Genome gab so Aufschluß über die in einem Wirt vorhandenen HBV-Subpopulationen.

Um zu kontrollieren, ob auch minore HBV-Populationen aus dem Serum der Patienten mittels dieser Methode noch erfasst werden konnten, wurden definierte Konzentrationen an HBV-DNA (1 HB Virus  $\equiv$  1 Genomäquivalent, GE) in kompetente E.coli transformiert, ausgestrichen und die resultierenden Kolonien ausgezählt. Als Vektor diente dabei das Plasmid pTHBV1.3 mit einem 1,3-fach überlangen HBV-Genom.

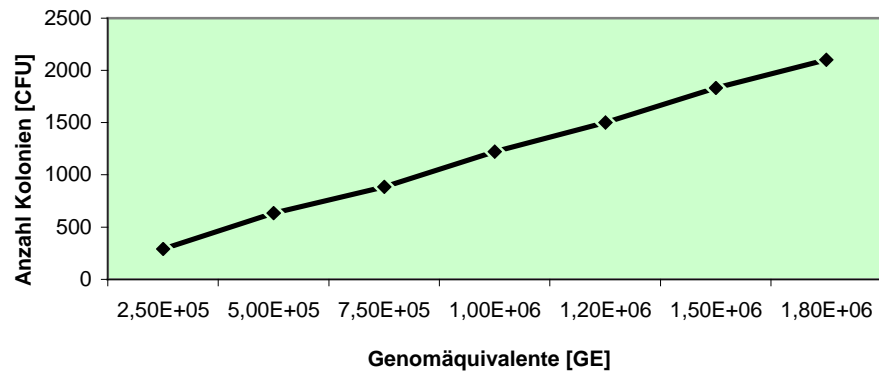


Abb 3.2 Korrelation der Menge von in E.coli transformierter HBV-DNA mit der Anzahl an resultierenden Kolonien auf einer 10cm Ø Agarplatte. GE: Genomäquivalent, entsprechend dem Genom eines HB Virus

Es zeigte sich, dass auch bei geringen HBV-DNA Mengen im Transformationsansatz noch ausreichend CFU gebildet wurden. Dies bedeutete zum einen, dass auch minore HBV-Populationen aus einem Patientenserum noch amplifiziert und kloniert werden konnten. Andererseits wurde deutlich, dass die Analyse aller in einem Individuum vorhandenen HBV-Quasispezies mit großem Aufwand verbunden wäre – pro Patient müssten 500 - 1000 CFU kloniert und sequenziert werden, um ein repräsentatives Bild der Zusammensetzung der HBV-Populationen zu gewinnen.

Durch die Beschränkung auf ca. 5 Klone pro Patient und Zeitpunkt wurde demnach mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die jeweils vorherrschende, majore HBV-Populationen erfasst. Auch minore Viruspopulationen konnten analysiert werden, allerdings wird das wirkliche Verhältnis der einzelnen Quasispezies zueinander nicht repräsentativ wiedergegeben worden sein. Es gilt also: eine majore Population wird als solche zu erkennen sein, minore Viruspopulationen werden stichprobenartig erfasst, jedoch nicht in ihrer Vollständigkeit.

Von jedem Patienten wurden zwischen 4 und 7 Klone aus der Serumprobe vor Adefovir-Therapiebeginn (Zeitpunkt 0, *baseline*) und ebenso nach mehreren Monaten Adefovirtherapie analysiert (Behandlungsdauer insgesamt zwischen 17 und 31 Monaten). Die CFU wurde in Flüssigmedium angezchtet und im Mini-Präparationsverfahren die gesamte Plasmid-DNA der Bakteriensuspension extrahiert. Die Vollständigkeit des HBV-Genomes konnte mit einem analytischen Restriktionsverdau überprüft werden. Danach erfolgte die Sequenzierung der RT-Domäne der HBV-Polymerase, wodurch ebenfalls das Gen des überlappenden kleinen Hüllproteins, HBsAg, analysiert werden konnte.

Die RT-Domäne der Polymerase wurde in mehreren Fragmenten sequenziert und anhand der Sequenz der überlappenden Enden zusammengefügt. Die vollständigen Sequenzen

der RT-Domäne wurden mit den jeweiligen Referenzgenotypen verglichen (siehe dazu auch Zöllner et al., 2004 [108]); Genotyp A: NCBI Genbank Nr. V00866 [98]; Genotyp D: NCBI Genbank Nr. V01460 [99], Genotyp G: NCBI Genbank Nr. AF160501[100]. Gegen die Referenzgenotyp-HBV-Stämme ist Adefovir wirksam [138].

Die phylogenetischen Bäume und Netzwerke der HBV Sequenzen wurden von Dr. Arne Ludwig am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung in Berlin erstellt.

### Korrelation von HBsAg und HBV-DNA im Serum

Von allen 14 Patienten wurden weiterhin in regelmäßigen Intervallen innerhalb des Beobachtungszeitraumes HBsAg-Titer bestimmt (Diagnostiklabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

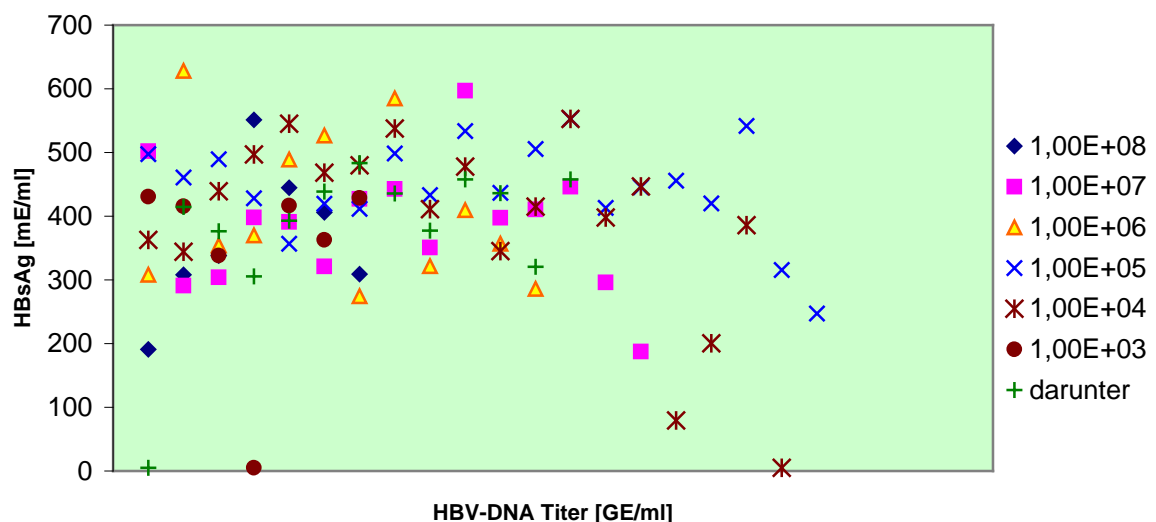


Abb. 3.3 Korrelation von HBsAg und HBV-DNA Titer. Insgesamt wurden 186 Werte aus 14 Patienten miteinander verglichen.

Obwohl die HBsAg-Bestimmung große klinische Bedeutung besitzt, korrelierten hohe HBsAg-Spiegel nicht mit hohen HBV-DNA-Titern und umgekehrt. Die niedrigsten HBsAg-Werte wurden zwar bei Patienten bestimmt, die zum selben Zeitpunkt auch eine niedrige Virämie aufwiesen, im mittleren Wertebereich war jedoch kein deutlicher Zusammenhang der beiden Parameter erkennbar.

Bei einem längerfristigen Therapieerfolg sinken in der Regel neben dem DNA-Titer auch die HBsAg-Werte. Dies trifft sowohl auf Interferon, als auch auf Lamivudin bzw. Adefovir [101] zu, allerdings kann dieser Zusammenhang unter Behandlung mit Interferon



deutlicher und schneller beobachtet werden als unter Nukleosidanaloga [102]. Da bei Therapie mit letzteren der Abfall des HBsAg vergleichsweise verzögert und wesentlich langsamer erfolgt, kann der HBsAg-Wert nicht als verlässlicher Indikator des Behandlungserfolges herangezogen werden; er kann eventuell ein prädiktiver Faktor für mangelndes Ansprechen auf antivirale Therapie sein [103]. Der HBsAg-Wert eignete sich demnach in erster Linie zur Verlaufsbeobachtung.

## Patient 1

### Infektion und Verlauf

Bei diesem 41-jährigen Mann liegt eine Infektion mit Genotyp A, Serotyp adw2 vor. Der Patient wurde bis unmittelbar vor Beginn der Adefovirtherapie mit Lamivudin behandelt.

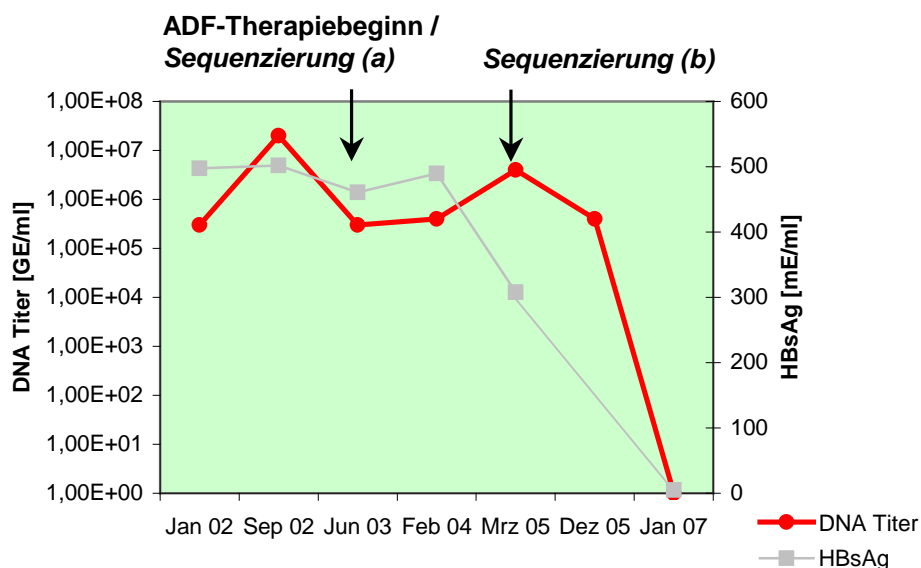


Abb. 3.4 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 1. Die Dokumentation begann 18 Monate vor Beginn der Adefovirtherapie und verlief insgesamt über 5 Jahre. Die beiden Zeitpunkte, zu denen Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 21 Monate.

Nachdem der HBV-DNA Titer unter Behandlung mit Lamivudin zwar um zwei Logstufen fiel, mit über 10<sup>5</sup> GE aber trotzdem vergleichsweise hoch blieb, kam es unter Adefovir zu einem viralen Titeranstieg von 1 Logstufe – die Therapie blieb unwirksam. Der weitere Behandlungsplan des Patienten nach März 2005 ist nicht bekannt, wahrscheinlich erfolgte der Wechsel auf ein anderes, neueres Nukleosidanalogon. Im Zeitraum von März 2005 bis Januar 2007 kam es erstmals im Beobachtungszeitraum zu einem deutlichen

Titerabfall; schließlich bis unter die Nachweisgrenze, die neue antivirale Therapie zeigte Erfolg. Bei diesem Patienten wird damit gleichzeitig deutlich, welche hohen Ansprüche an eine erfolgreiche antivirale Therapie bezüglich des HBV-DNA-Titerabfalls gestellt werden dürfen.

Der Verlauf des HBsAg korrelierte bei diesem Patienten in etwa mit dem DNA-Titerverlauf, wobei es allerdings bereits nach neun Monaten Adefovirtherapie zu einem Abfall um 200 mE/ml kam, ein Trend, der sich 21 Monate nach Beginn der Adefovirgabe parallel zum Abfall des HBV-DNA-Titers fortsetzte. Im Januar 2007 war kein HBsAg mehr nachweisbar (< 5 mE/ml).

### Sequenzierung der Klone

Die Sequenzierung der RT-Region der viralen Polymerase ergab folgende Mutationsprofile in den verschiedenen Klonen:

Patient 1									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 21 Monaten (b)				
Klon 4	Klon 5	Klon 7	Klon 9	Klon 10	Klon 1	Klon 7	Klon 10	Klon 13	Klon 14
R 55 H			D 83 N V 173 L			I 53 V S 57 P	A 62 T		
L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M				S 85 T	
M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V			Y 141 H		
			D 263 N					S 167 R	
H 271 Q	H 271 Q	H 271 Q	H 271 Q	H 271 Q				A 181 T	
					H 271 Q			S 256 G	V 190 M

Tab. 3.1 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 1 – vor und 21 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 21 Monaten bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Zum Ausgangszeitpunkt ließen sich in der gesamten Viruspopulation die Mutationen rtM204V und rtL180M nachweisen, dabei handelt es sich um ein typisches Lamivudin-Resistenzprofil. Zusätzlich zeigten alle untersuchten Genome eine weitere Mutation,

rtH271Q, die in keinem bekannten Zusammenhang zu Lamivudin-Resistenzen steht. Bei einem Klon trat zusätzlich die Mutation rtV173L auf, die zwar keine Resistenz vermittelt, aber kompensatorisch die durch das veränderte YMDD-Motiv beeinträchtigte Replikationsfähigkeit des Virus wiederherstellt (Delaney et al 2003 [72]).

Nach ca. zwei Jahren Adefovirtherapie ließen sich bis auf eine Ausnahme keine dieser Mutationen mehr in der viralen Population nachweisen. Lediglich rtH271Q fand sich bei einem Klon, der bis auf diese Abweichung völlig mit der Referenz-Sequenz übereinstimmte. Bei den restlichen vier Klonen konnten verschiedene vereinzelte Mutationen nachgewiesen werden, keine davon trat bei mehr als einem Klon auf. Bis auf rtA181T bei Klon 13 (b) ist bei keiner dieser Mutationen ein Zusammenhang mit Adefovirresistenz bekannt.

## Phylogenie

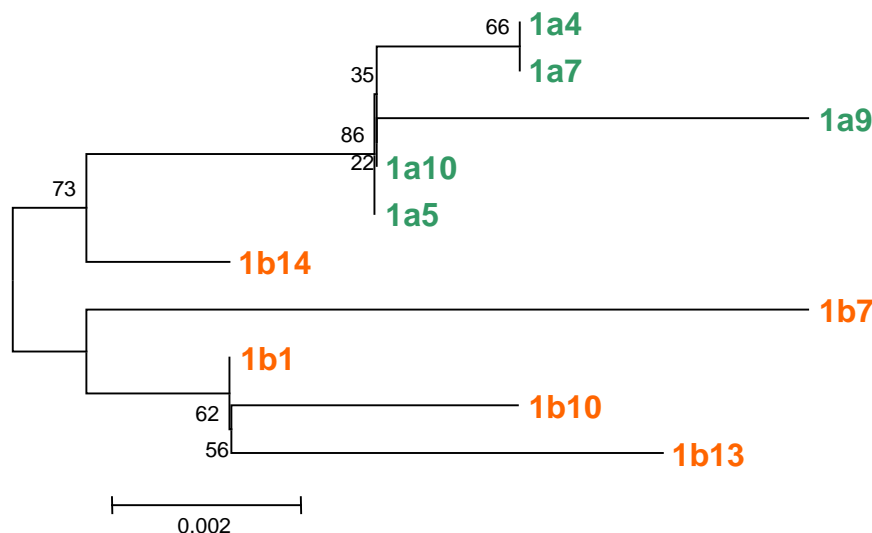


Abb. 3.5 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 1. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 1a: Klone von Patient 1 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 1b: Klone von Patient 1 nach 21 Monaten Adefovirtherapie

Bei diesem Patienten ließen sich die Populationen von (a)- und (b)-Klonen phylogenetisch auftrennen. Klon 14 (b) stand den viralen Subpopulationen vor Beginn der ADF-Therapie (a) genetisch näher als den restlichen (b)-Klonen. Alle anderen Klone ließen sich eindeutig in zwei Gruppen einordnen und demonstrierten so die deutlichen Unterschiede in den Populationen vor und 21 Monate nach Beginn der ADF-Therapie.

Die (a)-Populationen schienen ihren Ursprung in der von Klon 5 (a) repräsentierten Subpopulation zu haben. Klon 4 und 7 (a) wiesen eine enge Verwandtschaft auf, während

Klon 9 (a) sich von dem ursprünglichen, genetischen „Vorfahrensvirus“ am weitesten entfernt hatte.

Die virale Population hatte unter Adefovir die charakteristischen Lamivudin-Resistenzmutationen verloren und – indem unter Selektionsdruck und durch natürliche Variabilität neue Varianten entstanden – sich im Vergleich zu der ursprünglich vorhandenen Viruspopulation weiterentwickelt. Allerdings fand sich nur in einem von fünf untersuchten Klonen eine bekannte, mit ADF-Resistenz in Zusammenhang stehende Mutation, rtA181T. Der Anstieg des viralen Titers unter der Therapie ließ das Aufkommen von Adefovir-resistenten HBV-Stämmen vermuten; doch schienen in der viralen Population kaum bekannte resistenzvermittelnde Mutationen vorzukommen. Diese sollten aufgrund des Selektionsvorteils erwartungsgemäß rasch die dominante Variante im viralen Pool des Patienten bilden. So eine Variante herrschte hier nicht vor. Demnach erscheint fraglich, ob das Therapieversagen in diesem Fall auf eine einzige resistenzvermittelnde Mutation in der RT-Domäne der Polymerase zurückzuführen ist.

## **Patient 2**

### Infektion und Verlauf

---

Es handelt sich um einen 20-jährigen Patienten, bei dem es unter Adefovirtherapie im Verlauf von 18 Monaten nach einem kurzen, initialen HBV-Titeranstieg zu einem Abfall der Viruslast um drei Logstufen kam. 18 Monate nach Beginn der ADF-Therapie erreichte der HBV-Titer  $10^4$  GE/ml und schien sich auf diesem Niveau zu stabilisieren; auch ein Jahr später hatte sich dieser Wert noch nicht verändert. Im Gegensatz zu der hohen Virämie, die unter der vorhergehenden Lamivudintherapie bestand, lag nun zwar eine deutliche Besserung vor – da der Titer jedoch nicht unter  $10^4$  GE/ml sank und damit über der Nachweisgrenze blieb, konnte innerhalb von 18 Monaten Behandlung mit Adefovir per definitionem kein vollständiger Therapieerfolg erzielt werden.

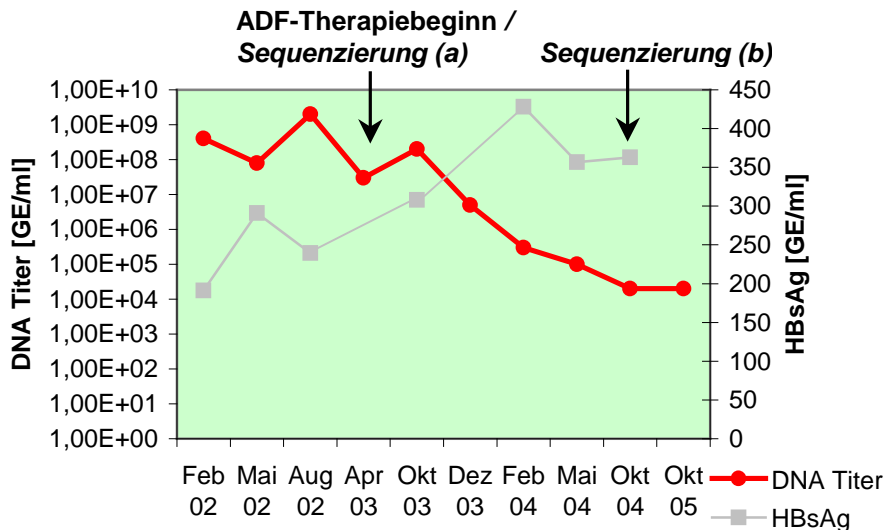


Abb. 3.6 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 2. Die Dokumentation begann 13 Monate vor und wurde bis 30 Monate nach Beginn der Adefovirtherapie fortgeführt. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 18 Monate.

Bereits ein halbes Jahr vor Beginn der ADF-Therapie begann das HBsAg kontinuierlich anzusteigen und erreichte ein Jahr nach Beginn derselben sein Maximum. HBsAg und DNA-Titer verhielten sich hier gegensätzlich. Die Adefovirtherapie zeigte zwar Wirkung, wie aus dem Abfall des viralen Titers deutlich wurde – dennoch gelang es nicht, die Viruslast bis unter die Nachweisgrenze zu senken. Dieser Patient wurde bis mindestens März 2007 mit Adefovir behandelt. Es lag eine HBV-Infektion mit Genotyp D vor, vor ADF-Therapiebeginn fand sich der Serotyp ayw2, nach 18 Monaten Therapie ayw4.

## Sequenzierung der Klone

Patient 2									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 18 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 3	Klon 4	Klon 6	Klon 11	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 7	Klon 9
S 21 A	S 21 A	S 21 A F 88 S L 102 J	S 21 A	S 21 A	S 21 A Y 54 H L 80 V	S 21 A Y 54 H	S 21 A Y 54 H	S 21 A Y 54 H L 80 V	S 21 A Y 54 H
L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F		L 91 I	L 91 I		L 91 I
N 123 D	N 123 D	N 123 D	N 123 D	N 123 D	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F
N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H
P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q
D 131 N	D 131 N	D 131 N		D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N
Y 135 S	Y 135 S Y 203 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S		V 173 L	V 173 L		V 173 L
	S 213 T			V 208 I	M 204 I	M 204 I	M 204 I	L 180 M	M 204 I
N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H		I 233 V	I 233 V	I 233 V	I 233 V
		S 219 A				G 251 S			
E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D
			K 270 T		E 271 D			E 271 D	
I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V

Tab. 3.2 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 2 – vor Behandlung mit Adefovir und 18 Monate nach Therapiebeginn. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 18-monatiger Adefovir-Behandlung bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Auch bei diesem Patienten schloss sich die Adefovirtherapie unmittelbar an eine Lamivudinbehandlung an. Dennoch waren keine bekannten, mit Lamivudinresistenz assoziierten Mutationen in der viralen Ausgangspopulation nachweisbar. Die einzige Mutation in dem für Lamivudinresistenz kritischen YMDD-Motiv fand sich bei Klon 3 (a), (rtY203C).

Besonderes Augenmerk verdiente das Auftreten der Mutation rtM204I bei allen nach 18-monatiger Therapie untersuchten Klonen, da diese Veränderung im aktiven Zentrum der RT-Domäne keine Resistenz gegenüber Adefovir, wohl aber gegen Lamivudin vermittelt.

Bei drei Klonen trat zusätzlich die Mutation rtV173L, bei einem weiteren rtL180M auf. Auch diese Mutationen treten bevorzugt unter Lamivudintherapie auf.

Von dem selben Patienten wurden zum Zeitpunkt 0 (vor Therapiebeginn) und 10 (10 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir) zusätzlich Direktsequenzierungen aus entsprechenden PCR-Produkten am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein ca. 150 Aminosäuren langes Fragment der RT-Domäne untersucht. Die Sequenzen der fünf (a)-Klone stimmten mit der Direktsequenzierung zum Zeitpunkt 0 erwartungsgemäß überein. Auch nach 10 Monaten ADF-Therapie konnten die Mutationen rtM204I sowie I233V nicht durch Direktsequenzierung nachgewiesen werden. Sie schienen also noch nicht in der HBV-Majorpopulation des Wirts vorhanden gewesen zu sein, ansonsten hätten sie bei diesem Verfahren erfasst werden müssen.

18 Monate nach Beginn der ADF-Therapie fanden sich rtM204I und rtI233V durchgängig bei allen Klonen. Die Lamivudinresistenz-Mutation trat hier also frühestens 10 Monate nach Beendigung der Lamivudintherapie auf.

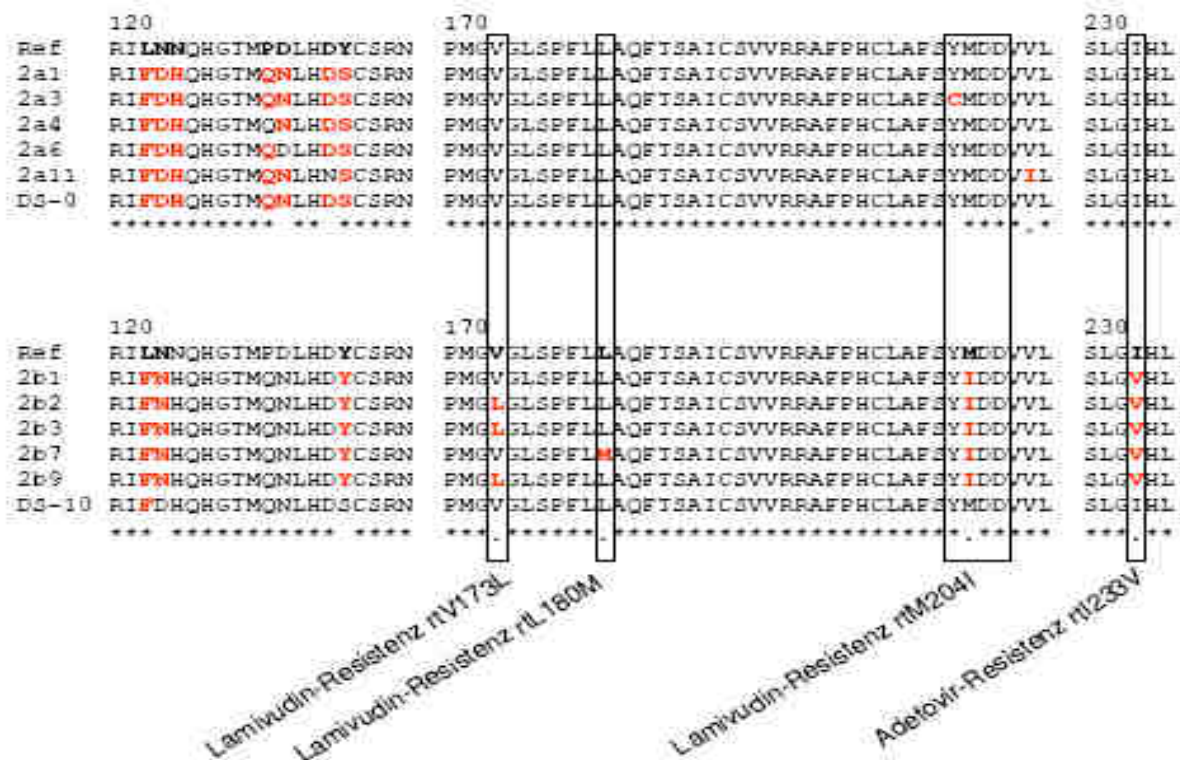


Abb. 3.7 Vergleich der Sequenzen von Patient 2 vor und 10 sowie 18 Monate nach Beginn der Adefovirtherapie. Sequenzen aus Klonierung sowie Direktsequenzierung. Ref.: Referenzgenotyp; DS-0: Direktsequenzierung zum Zeitpunkt 0; DS-10: Direktsequenzierung 10 Monate später; (a)-Klone: vor ADF-Behandlungsbeginn; (b)-Klone: 18 Monate nach Beginn der ADF-Therapie

Das Auftreten von Lamivudin-Resistenzmutationen Monate nach dem Absetzen dieser Therapie erschien ungewöhnlich, da rtM204I die Replikationsfähigkeit des Virus reduziert und die Mutation daher schnell revertieren sollte. Trotz möglicher Kompensation durch rt173L bzw. rtL180M sollten diese Mutationen dem Virus unter Adefovir-Therapie keinen Selektionsvorteil bieten, aus dem sich eine Majorpopulation entwickeln könnte.

Alle untersuchten Klone wiesen nach Therapie zusätzlich rtI233V auf, eine mit Adefovirresistenz einhergehende Variante. Obwohl diese Mutation auch natürlich vorkommt, schien sie in diesem Fall selektioniert worden zu sein. Eine andere Mutation, rtL80V, wird sowohl im Zusammenhang mit Adefovir- als auch mit Lamivudinresistenz diskutiert [104].

Die Positionen der RT-Domäne, an denen sowohl bei den (a) als auch bei den (b) Populationen Abweichungen bestanden (siehe Tab. 3.2, schwarz eingezeichnete Mutationen) lagen größtenteils in den variablen Regionen des Enzyms, es könnte sich dabei um natürliche Polymorphismen handeln .

## Phylogenie

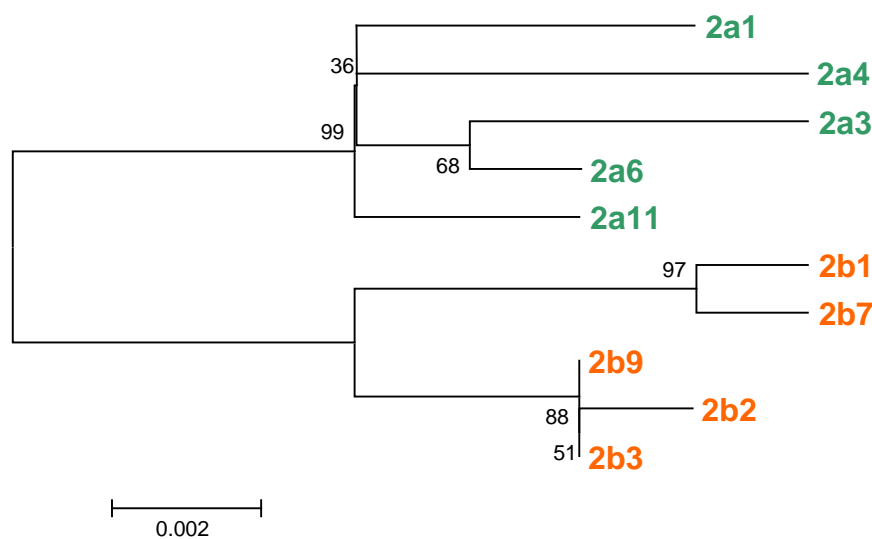


Abb. 3.8 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 2. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 2a: Klone von Patient 2 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 2b: Klone von Patient 2 nach 18-monatiger Adefovirtherapie

Anhand des gepaarten Auftretens der neu aufgetretenen Mutationen (rtL80V / rtE271D; L91I / V173L) lag die Interpretation nahe, dass zum Zeitpunkt der zweiten Klonierung / Sequenzierung mindestens zwei verschiedene Subpopulationen koexistierten. Bestätigt



wurde dies durch die phylogenetische Analyse, die die Klone nach 18 Monaten ADF-Therapie in zwei Gruppen einordnet (Klon 1 und 7 (b) stehen Klon 9, 3 sowie Klon 2 (b) gegenüber).

Im phylogenetischen Netzwerk imponierten (a)- und (b)-Klone als zwei getrennte Gruppen. Die (b)-Population nach Adefovirtherapie wies dabei einen größeren Abstand zum gemeinsamen genetischen „Vorfahr-Virus“ auf als die (a)-Klone. Ob die (b)-Population aus der (a)-Gruppe hervorging, oder unabhängig von ihr bereits vor Therapiebeginn als Minorpopulation koexistierte, konnte nicht endgültig beantwortet werden – wobei die genetische Distanz zwischen den beiden Populationen und der Wechsel des Serotyps von ayw2 zu ayw4 letzteres nahe legte.

### Patient 3

#### Infektion und Verlauf

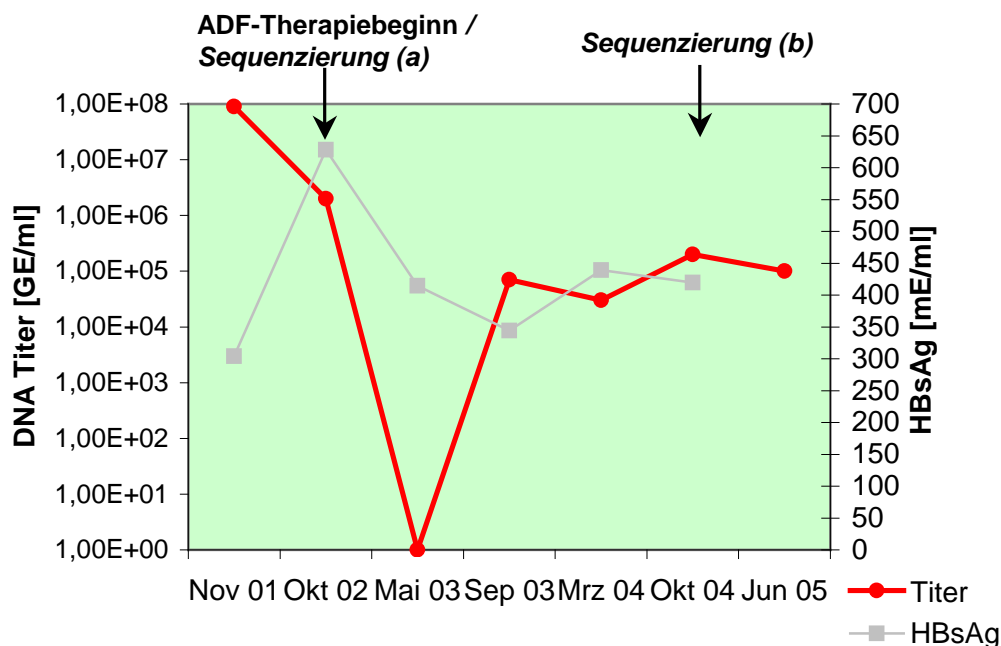


Abb. 3.9 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 3. Die Dokumentation begann ein Jahr vor Adefovirtherapie und wurde insgesamt 33 Monate fortgesetzt. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 24 Monate.

Dieser Patient, ein 39-jähriger Mann, infizierte sich mit HBV-Genotyp D. Vor Beginn der Therapie mit Adefovir lag Serotyp ayw3 vor, nach zwei Jahren unter Adefovir Serotyp ayw4, im Verlauf der ADF-Behandlung kam es also auch hier zu einem Serotypwechsel.

Auch bei diesem Patienten ging eine Lamivudintherapie der Adefovirbehandlung direkt voraus. Die Therapie mit Adefovir wurde bis einschließlich 2006 durchgeführt, danach erfolgte die Umstellung auf Tenofovir. Wenige Monate nach Beginn der Therapie sank der HBV-Titer unter die Nachweisgrenze, stieg innerhalb von 16 Wochen aber wieder sprunghaft auf  $10^5$  GE/ml an und blieb im weiteren Verlauf auf dieser Ebene konstant. Bei diesem Patienten kann also von initialem Behandlungserfolg mit *Virämie-rebound* gesprochen werden.

Der HBsAg-Spiegel folgt dem Trend des Titers mit leichter Verzögerung. Im ersten Jahr der Therapie fiel das HBsAg von 650 mE/ml auf 400 mE/ml und erreichte damit ein konstantes Plateau. Insgesamt kam es unter ADF-Therapie zu einem HBV-DNA-Titerabfall um eine Logstufe. Im Jahr vor Beginn der Adefovirgabe, also noch unter Lamivudin, sank der virale DNA-Titer um 2 Logstufen, auch wenn mit über  $10^6$  GE/ml weiterhin eine hohe Virämie bestand. Der Titer folgte also bereits vor Behandlungsbeginn mit Adefovir einem Abwärtstrend.

### Sequenzierung der Klone

---

Am Ende der Lamivudintherapie fanden sich bei allen Klonen die Resistenzmutationen rtM204I und rtL173V sowie zusätzlich, bis auf eine Ausnahme, rtL180M. rtM204I konnte noch zwei Jahre nach Beendigung dieser Therapie nachgewiesen werden, ebenso, bei je einem weiteren Klon, die Mutationen rtV173L sowie rtL180M. In der Regel kommt es kurz nach Therapieende zum Verschwinden der Resistenzmutationen, da sie – z.B. bei einem veränderten YMDD-Motiv – die Replikationsrate des Virus negativ beeinflussen. Hier beobachtete man stattdessen eine Persistenz.

Zwei Jahre nach Beginn der Therapie mit Adefovir ließ sich bei allen Klonen rtI233V, eine Adefovir-Resistenzmutante, nachweisen. Das Aufkommen dieser Variante könnte den Wiederanstieg des HBV-Titers nach anfänglichem Therapieerfolg erklären.

Patient 3							
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)				Nach 24 Monaten (b)			
Klon 4	Klon 5	Klon 9	Klon 12	Klon 3	Klon 5	Klon 6	Klon 7
I 16 T	I 16 T	I 16 T	I 16 T	S 21 A			
A 38 E	A 38 E	A 38 E	A 38 E	Y 54 H			
		G 127 R			L 80 I	L 80 I	L 80 V
D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N		Y 89 C		
	Q 149 P					L 91 I	
V 173 L	V 173 L	V 173 L	V 173 L	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F
	L 180 M	L 180 M	L 180 M	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H
M 204 I	M 204 I	M 204 I	M 204 I	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q
P 237 H	P 237 H	P 237 H	P 237 H	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N
				V 173 L			L 180 M
				M 204 I	M 204 I	M 204 I	M 204 I
				I 233 V	I 233 V	I 233 V	I 233 V
				E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D
							E 271 D
				I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V

Tab. 3.3 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 3 – vor und 2 Jahre nach Behandlungsbeginn mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die 2 Jahre nach Beginn der Adefovir-Behandlung bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

## Phylogenie

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass sich die Viruspopulation nach 24-monatiger Adefovirtherapie deutlich von der Population zu Therapieanfang unterschied, wofür auch der Wechsel des Serotyps spricht (ayw3 zu ayw4). Zu Therapiebeginn ließen sich die viralen Subpopulationen in zwei Gruppen einteilen: 1.; Klon 12 (a), aus dem Klon 9 (a) hervorging, sowie 2.; Klon 4 und 5 (a).

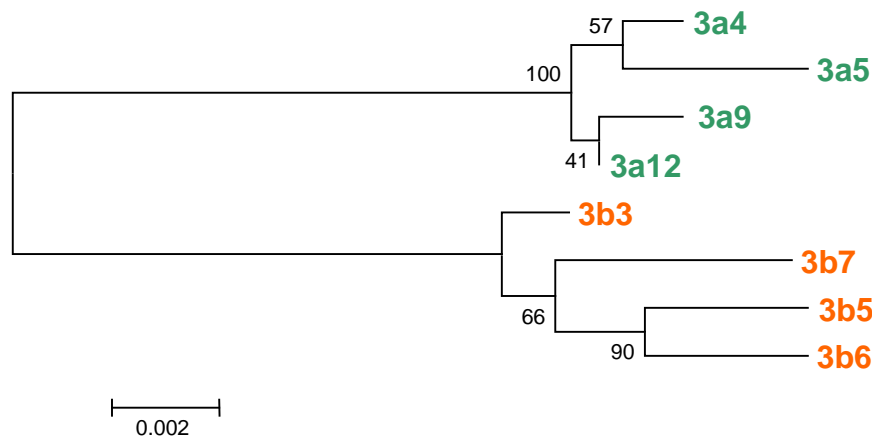


Abb. 3.10 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 3. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 3a: Klone von Patient 3 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 3b: Klone von Patient 3 nach 24 Monaten Adefovirtherapie

Nach 2-jähriger Adefovirtherapie lag eine neue, bisher nicht detektierte virale Majorpopulation vor. Zwischen ihr und den zu Beginn der Therapie analysierten Klonen schien keine phylogenetische Ähnlichkeit zu bestehen, trotz der persistierenden Lamivudin-Resistenzmutationen. Von allen analysierten Klonen wies 3 (b) die am stärksten konservierte Sequenz auf. Die größte genetische Ähnlichkeit bestand zwischen den Klonen 5 und 6 (b), die sich gleichzeitig auch genetisch am weitesten vom gemeinsamen Vorfahrensvirus entfernt hatten.

## Patient 4

### Infektion und Verlauf

---

Bei diesem 42-jährigen Mann lag eine Infektion mit Genotyp A, Serotyp adw2, vor. Unter Adefovirtherapie konnte über 17 Monate hinweg kein Abfall der Viruslast erreicht werden, stattdessen kam es zu einem HBV-DNA-Titeranstieg von insgesamt einer Logstufe. Der Adefovirtherapie direkt voraus ging eine antivirale Therapie mit Lamivudin, unter der eine hohe Virämie mit  $10^7$  GE/ml bestand. Auch im weiteren Verlauf fiel die Viruslast nicht ab, sondern blieb konstant zwischen  $10^7$  und  $10^8$  GE/ml.

HBsAg schwankte während des Beobachtungszeitraumes zwischen 320 und 420 mE/ml, der höchste HBsAg-Spiegel wurde 22 Monate nach ADF-Therapiebeginn bestimmt.

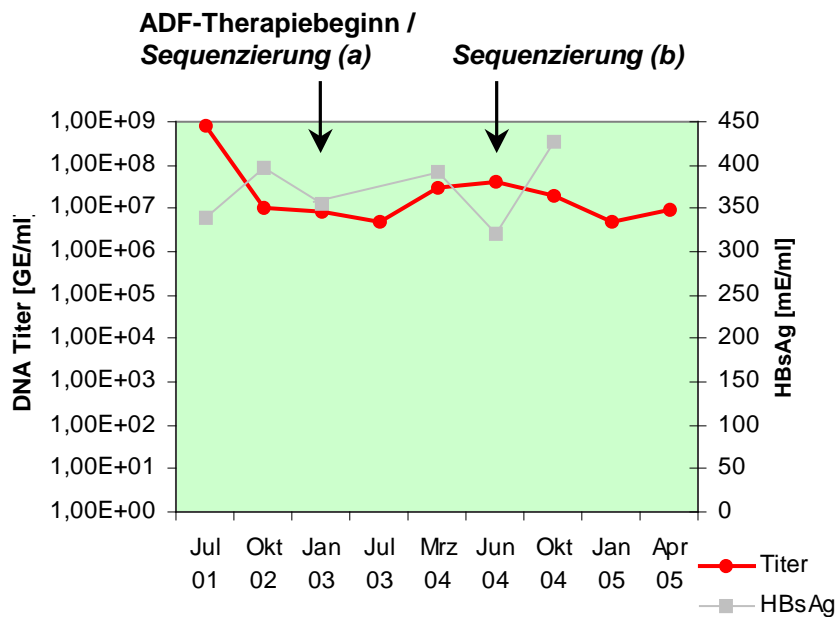


Abb. 3.11 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 4. Die Dokumentation begann 18 Monate vor der Umstellung auf Adefovir und wurde 27 Monate fortgesetzt. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 17 Monate.

### Sequenzierung der Klone

Trotz Lamivudin-Therapieversagen fanden sich die bekannten resistenzvermittelnden Mutationen M204V und L180M lediglich bei zwei von fünf untersuchten Klonen. Sie schienen also keine Majorvariante in der HBV-Gesamtpopulation darzustellen.

Man geht davon aus, dass in dem viralen Genompool des Wirts bei Lamivudinresistenz das entsprechende Resistenzmutationsprofil (rtM204I oder rtM204V, bzw. rtL180M, rtV173L) dominiert [105]. Unter diesem Gesichtspunkt stellte sich die Frage, ob die zum Zeitpunkt 0 (vor ADF-Therapiebeginn) sequenzierten Klone eine repräsentative Wiedergabe der viralen Gesamtpopulation darstellten.

Patient 4											
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 17 Monaten (b)						
Klon 1	Klon 3	Klon 4	Klon 5	Klon 13	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 5	Klon 11	Klon 12	Klon 13
	F 51 V A 87 V L180M M204 V M204V Y252 C		W79 R  V278A K318R	F 49 S			A113V	V43A G107E A181T		N279H	

Tab. 3.4 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 4 – vor und 17 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 17 Monaten bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Generell fanden sich zum Zeitpunkt 0 bei allen Klonen nur wenig Abweichungen von der Wildtypsequenz und keine weiteren bekannten Lamivudinresistenz-Mutationen.

Im Verlauf der Adefovirtherapie entwickelte sich die Viruspopulation noch weiter in Richtung der ursprünglichen HBV-Referenzsequenz. Von 7 untersuchten Klonen fanden sich nur bei dreien Sequenzabweichungen, darunter nur bei einem eine bekannte Resistenzmutation, rtA181T bei Klon 5 (b).

Bei diesem Patienten versagten – obwohl nur bei einer geringen Anzahl der untersuchten Klone bekannte resistenzvermittelnde Mutationen vorlagen – sowohl Lamivudin als auch Adefovirtherapie. Bei letzterer fiel der HBV-Titer über den gesamten Behandlungszeitraum hinweg kaum unter  $10^7$  GE/ml. Lamivudin und Adefovir sind gegen HBV mit der Referenz- bzw. Wildtypsequenz – wie sie bei vier Klonen unter ADF-Therapie nachweisbar war – normalerweise wirksam. Es musste also eine andere Ursache der antiviralen Resistenz in Erwägung gezogen werden, z.B. zelluläre, wirtsspezifische Mechanismen oder Resistenzvermittlung durch Mutationen ausserhalb der RT-Domäne.

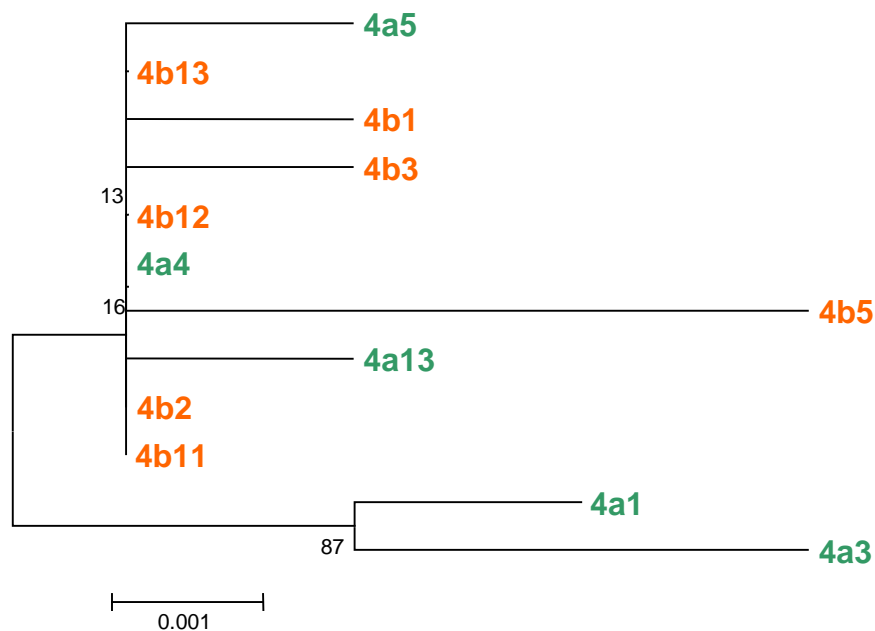


Abb. 3.12 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 4. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 4a: Klone von Patient 4 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 4b: Klone von Patient 4 nach 17 Monaten ADF-Therapie

Bei den meisten Patienten ließen sich die untersuchten Sequenzen zu Beginn und nach Monaten oder Jahren der Adefovirtherapie in zwei Gruppen einordnen, da sich die virale Population unter Selektionsdruck deutlich veränderte. Bei Patient 4 jedoch schienen die phylogenetischen Grenzen zwischen (a)- und (b)-Klonen aufgehoben, die Klone unterschieden sich zwar voneinander, waren aber nicht in verschiedene *Cluster* abzugrenzen. Die Anordnung der verschiedenen Sequenzen innerhalb des phylogenetischen Baumes gab wenig Aufschluß, bis auf die Ähnlichkeit der Klone 1 und 3 (a) konnten die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Klone untereinander nicht statistisch signifikant dargestellt werden. Auch innerhalb des phylogenetischen Netzwerks (s. Abb. 3.41) waren die (a) und (b) Klone sowohl innerhalb ihrer Population als auch untereinander sehr divers verteilt und wiesen eher wenig genetische Ähnlichkeit auf. Ob man von mehreren Subpopulationen, die sich zwar irgendwann einen gemeinsamen Ursprung aufwiesen, sich aber seither weiterentwickelten, oder von einer in sich sehr diversen Einzelpopulation sprechen sollte, konnte nicht beantwortet werden.

Eine Erklärung könnte sein, dass – z.B. durch einen Resistenzmechanismus auf zellulärer Ebene – Adefovir nicht ausreichend auf die Viruspopulation einwirken konnte. Sollte dies der Fall gewesen sein, wären ähnliche Schwierigkeiten auch bei anderen

Nukleosidanaloga nicht unwahrscheinlich, wodurch demnach das schlechte Ansprechen auf die vorhergehende Lamivudinbehandlung erklärt werden könnte.

In diesem Fall würde sich auch ein phylogenetischer Baum wie in Abb. 3.12 durch die ungestörte natürliche Entwicklung von HBV-Populationen in einem Wirt erklären.

## Patient 5

### Infektion und Verlauf

Bei diesem 25-jährigen Patienten (Infektion mit Genotyp D, Serotyp ayw / ayw3) bestand Therapienaivität, d.h. es wurde bis zum Beginn der Adefovirbehandlung kein Selektionsdruck durch Nukleosidanaloga auf den viralen Genompool ausgeübt.

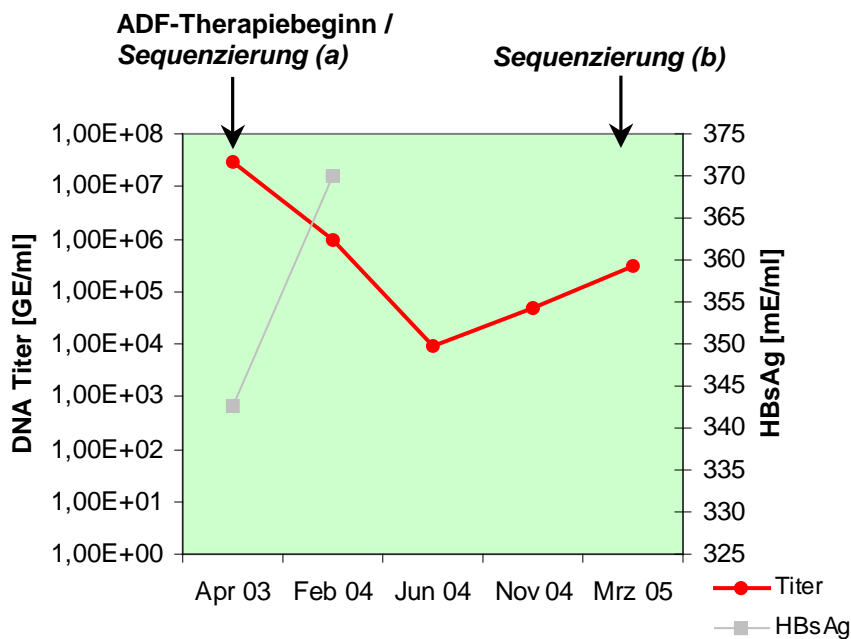


Abb. 3.13 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer unter Behandlung mit Adefovir bei Patient 5. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 24 Monate.

HBsAg wurde nur zweimal, im April 2003 und Februar 2004, bestimmt.

Bei diesem Patienten fiel der HBV-Titer während des Behandlungsintervalls um insgesamt zwei Logstufen. Da die Viruslast jedoch zu keinem Zeitpunkt unter die Nachweisgrenze gesenkt werden konnte, bestand auch hier per definitionem kein Therapieerfolg. Nachdem der Patient zunächst mit einem Absinken der Virämie auf die Adefovirtherapie reagierte, kam es nach 14 Monaten zum plötzlichen Anstieg der



Viruslast, was zunächst an das Aufkommen einer resistenten HBV-Population denken ließ.

### Sequenzierung der Klone

Da bei diesem Patienten vor ADF-Behandlungsbeginn noch keine andere Therapie durchgeführt worden war, fanden sich zum Zeitpunkt 0 (vor ADF-Therapie) auch keine bekannten, mit Resistenz assoziierten Mutationen – obwohl die Sequenzen stark von der Referenzsequenz abweichen. Die hier aufgetretenen Abweichungen von der Genotyp-Referenzsequenz ließen sich in den viralen Populationen mehrerer Patienten nachweisen und scheinen in variablen Regionen der RT-Domäne zu liegen. Lediglich rtS78T (1 Klon) und rtN248H (3 Klone) liegen in konservierten Bereichen (A und E, s. Abb. 3.38).

Patient 5							
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)			Nach 24 Monaten (b)				
Klon 2	Klon 11	Klon 42	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A		S 21 A	S 21 A
<b>S 78 T</b>			L 122 F	L 122 F		L 122 F	L 122 F
L 122 F	L 122 F	L 122 F	P 130 Q	P 130 Q		P 130 Q	P 130 Q
		<b>H 126 Y</b>	D 131 N	D 131 N		D 131 N	D 131 N
P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	Y 135 S	Y 135 S		Y 135 S	Y 135 S
D 131 N	D 131 N	D 131 N				<b>S 230 P</b>	
Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S			<b>N 236 T</b>		
N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H		N 248 H	N 248 H
E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D		E 263 D	E 263 D
Q 267 H	Q 267 H	Q 267 H	Q 267 H	Q 267 H		Q 267 H	Q 267 H
I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V		I 278 V	I 278 V
	<b>A 297 S</b>						
		<b>C 332 Y</b>					

Tab. 3.5 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 5 – vor und 2 Jahre nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 24 Monaten unter ADF-Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Nach zweijähriger Adefovirtherapie wiesen vier von fünf untersuchten Klonen keine wesentlichen Veränderungen innerhalb ihrer RT-Domäne auf, abgesehen von Substitutionen, bei denen es sich wahrscheinlich um Polymorphismen handelte. Bei Klon

3 (b) bestand fast vollkommene Homologie mit der Referenzsequenz – bis auf die Adefovirresistenzmutation rtN236T. Vorausgesetzt, es handelt sich bei den untersuchten Klonen um eine repräsentative Darstellung der viralen Populationen, so lag lediglich bei einer Minorpopulation eine bekannte Resistenzmutation vor, was das Therapieversagen nicht ausreichend erklärt. Es stellte sich die Frage, ob ausschließlich bei einem von fünf Klonen echte Resistenz bestand. Bei den anderen Klonen könnte z.B. durch eine einzelne oder die Kombination aus mehreren bisher unbeschriebenen Mutationen Resistenz vermittelt worden sein. ADF-Resistenz könnte auch auf zellulärer bzw. wirtsspezifischer Ebene bereits vor der Therapie existiert haben.

Bei einem deutlichen Selektionsvorteil der rtN236T-Population wäre jedenfalls nach zwei Jahren Therapie ein Überwiegen dieser Variante zu erwarten gewesen.

## Phylogenie

---

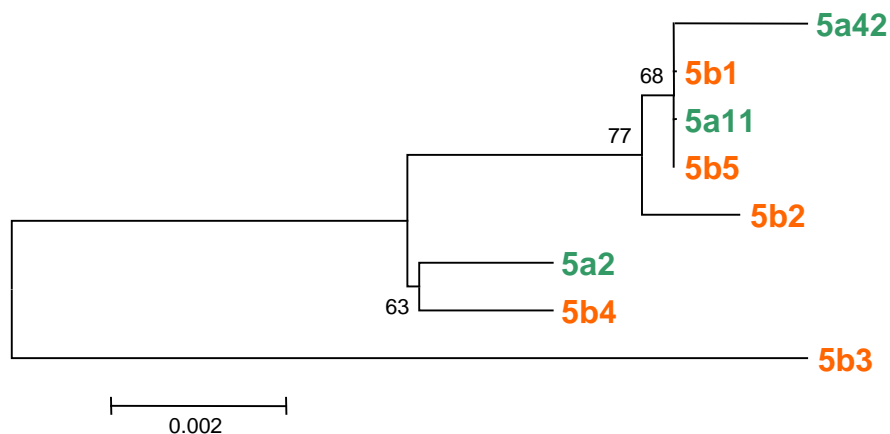


Abb. 3.14 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 5. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 5a: Klon von Patient 5 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 5b: Klon von Patient 5 nach 2 Jahren Adefovirbehandlung

Auch hier ließen sich die HBV-Populationen vor und nach 24 Monaten Therapie phylogenetisch nicht deutlich auftrennen. Die Klone 2 (a) und 4 (b) bildeten eine, vom ursprünglichen „Vorfahr-Virus“ noch nicht so weit entfernte Gruppe; dem gegenüber standen die stärker veränderten Klone 1 (b), 2 (b) und 5 (b). Zwischen letzterem und den Klonen 11 (a) sowie 1 (b) bestand enge genetische Verwandtschaft. Am weitesten vom gemeinsamen Vorfahren entfernt lagen die Sequenzen von Klon 42 (a) und Klon 3 (b). Klon 3 (b), der einzige Klon mit einer bekannten Adefovirresistenzmutation (rtN236T) stand allen anderen Klonen gegenüber. Möglicherweise handelte es sich hier um eine

Minorpopulation, die bereits vor Therapiebeginn vorhanden war und im Behandlungsverlauf selektioniert wurde, so dass sie erst 24 Monate nach Beginn der ADF-Therapie methodisch erfasst werden konnte. Aus dem phylogenetischen Netzwerk (Abb. 3.42, S.124) ging hervor, dass die durch Klon 3 (b) repräsentierte Population keine phylogenetische Ähnlichkeit zu den anderen (b) - Klonen aufwies. Alle (a)-Klone hingegen fielen durch große genetische Nähe zu Klon 5 (b) auf und die meisten (b)-Klone ließen sich auf diese Sequenz zurückverfolgen. 24 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir lagen also mindestens zwei sehr divergente HBV-Populationen vor: eine, die von Klon 5 (b) repräsentiert wurde, sowie eine neu aufgekommene Quasispezies, die eventuell schon als Minorvariante zu Beginn der ADF-Therapie vorlag, aber noch nicht nachweisbar war. Nur in dieser neuen Population fand sich die Resistenzmutation rtN236T, diese Quasispezies könnte also unter Adefovir selektioniert worden sein. Allerdings wäre anzunehmen, dass eine HBV-Variante mit Selektionsvorteil durch ADF-Resistenz rasch die Majorpopulation bilden würde. So musste hier entweder davon ausgegangen werden, dass die Auswahl der fünf (b)-Klone die Zusammensetzung der HBV-Subpopulationen in diesem Patienten nicht repräsentativ wiedergab, dass die Mehrheit der (b)-Klone Adefovir-Resistenz anderweitig erwarb oder dass die Mutation rtN236T in diesem Fall keinen ausreichenden Selektionsvorteil bot.

## **Patient 6**

### Infektion und Verlauf

---

Bei diesem 62-jährigen Patienten lag eine Infektion mit HBV-Genotyp A, Serotyp adw2 vor. Er wurde vor Beginn der Adefovirtherapie mit Lamivudin behandelt; zwischen dem Ende der Lamivudinbehandlung und der Umstellung auf Adefovir bestand ein dreimonatiges Intervall ohne Therapie.

Zu Anfang der Adefovirtherapie erreichte der HBV-DNA-Titer seinen niedrigsten Wert innerhalb des Beobachtungszeitraumes, stieg im Verlauf jedoch um 3 Logstufen an und lag schließlich für lange Zeit bei  $10^8$  GE/ml, so dass man von einem ausgeprägten Therapieversagen sprechen kann. In den letzten 6 Monaten vor der zweiten Sequenzierung fiel der HBV-Titers um eine Logstufe. Im Jahr darauf kam es jedoch erneut zu einem HBV-DNA-Titeranstieg, die Viruslast konnte langfristig nicht gesenkt werden. Der HBsAg-Verlauf folgte in etwa dem des DNA-Titers, fiel allerdings bereits nach einem Jahr unter Adefovirtherapie ab und erreichte nach zwei Jahren mit 270 mE/ml seinen niedrigsten Wert, bei einer gleichzeitigen Viruslast von  $10^7$  GE/ml.

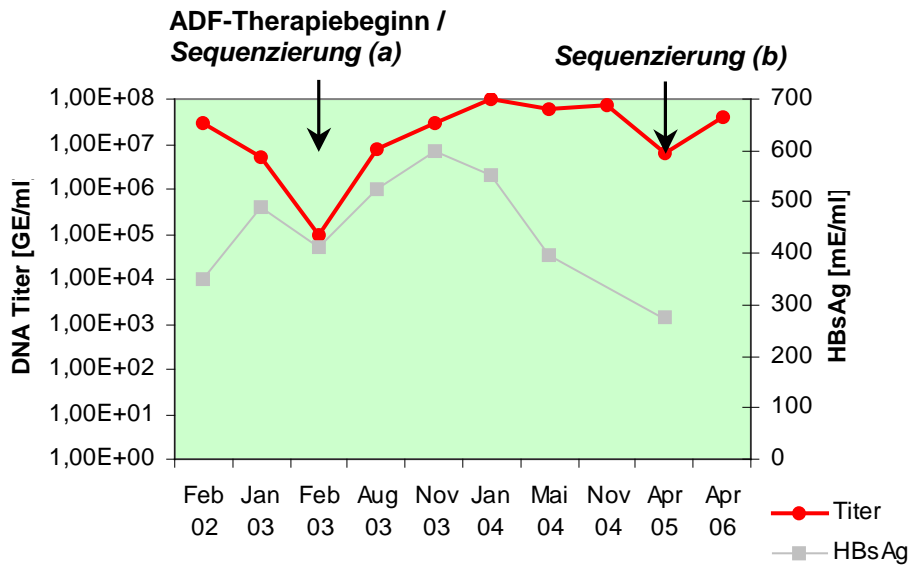


Abb. 3.15 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 6. Die Dokumentation begann ein Jahr vor der ersten Adefovirgabe und endete 3 Jahre und 2 Monate danach. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 26 Monate.

### Sequenzierung der Klone

Bekannte Lamivudin-Resistenzmutationen fanden sich initial bei drei von fünf Klonen, bei einem rtA181T, bei zweien die typische Kombination aus rtL180M und rtM204V.

Patient 6									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 26 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 4	Klon 11	Klon 13	Klon 1	Klon 2	Klon 5	Klon 31	Klon 33
Y 126 H		L 180 M		L 180 M	S 78 P	R 110 K			
A 181 T		M 204 V		M 204 V		A 181 T			
		W 257 R		L 229 V		Y 143 C			
					N 337 T	I 152 V			

Tab.3.6 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 6 – vor und 26 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 26 Monaten unter Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Zwei Jahre nach Beginn der Adefovirbehandlung imponierte eine relativ homogene Viruspopulation, wobei lediglich Klon2 eine Resistenzmutation, rtA181T, aufwies. Bei den meisten Klonen entsprach die Aminosäuresequenz der RT-Domäne der Referenzsequenz (HBV-Wildtyp). Wie erwartet verschwand die Lamivudinresistenzmutation rtM204V im Verlauf der Adefovirtherapie, ebenso die kompensatorische Mutation rtL180M.

## Phylogenie

Die phylogenetische Analyse zeigte erwartungsgemäß, dass 2/5 der Klone vor Beginn der ADF-Behandlung und 3/5 der Klone zwei Jahre danach eine dem HBV-Referenzstamm homologe Sequenz aufwiesen.

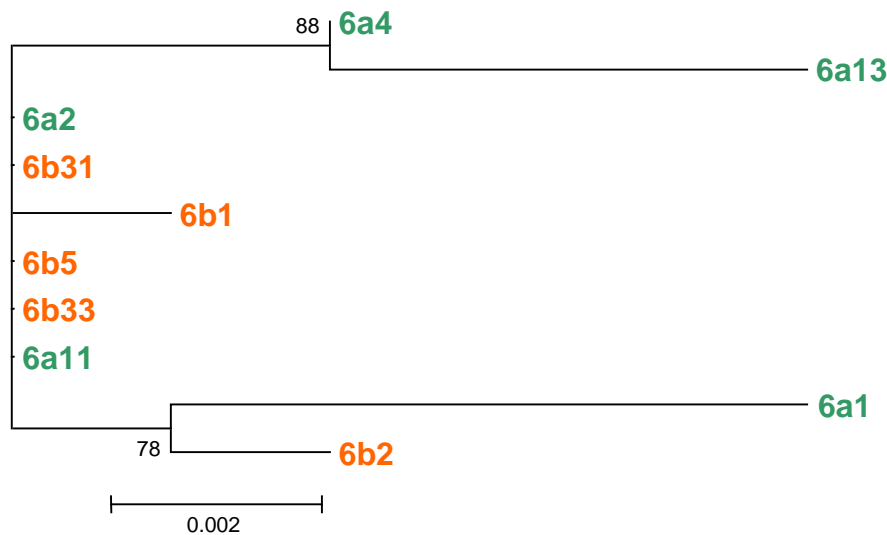


Abb. 3.16 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 6. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 6a: Klone von Patient 6 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 6b: Klone von Patient 6 nach 26 Monaten ADF-Behandlung

Die übrigen Klone entfernten sich genetisch geringfügig von der HBV-Referenzsequenz, dabei gingen jeweils Klon 1 (a) und 2 (b) sowie 4 (a) und 13 (a) aus einem gemeinsamen Vorfahren hervor. Dies ließ den Rückschluss zu, dass Klon 2 (b) mit der ADF-Resistenzmutation rtA181T aus einer Subpopulation hervorging, die – hier repräsentiert von Klon 1(a) – bereits vor ADF-Therapiebeginn vorhanden war. Der gemeinsame Ursprung von Klon 4 und 13 (beide a) spiegelte sich auch darin wieder, dass nur bei diesen beiden das bekannte Lamivudinresistenzmuster rtM204V / rtL180M nachweisbar war.

Es ist zu bemerken, dass sich die einzige hier vorhandene bekannte Resistenzmutation rtA181T nicht in der Gesamtpopulation der Viren durchsetzen konnte. Die Untersuchung

der phylogenetischen Beziehungen zwischen den HBV-Klonen zeigte so zum einen, was bereits in Tab. 3.6 deutlich wurde: Während der ADF-Therapie näherten sich die viralen Subpopulationen genetisch der HBV-Wildtypsequenz an. Zum anderen gelang auch bei diesem Patient keine deutliche Aufteilung in (a)- und (b)-Klone. Im phylogenetischen Netzwerk (Abb. 3.41, S.122) ließen sich weder (a) noch (b) – Klone gemeinsamen Vorfahrensviren zuordnen, so dass man auch hier von einer einzigen, genetisch sehr divergenten Viruspopulation sprechen könnte. Unter ADF-Therapie schien keine neue Population selektiert worden zu sein. Da dieser Patient trotz Behandlung mit Adefovir hoch virämisch blieb und weder bekannt resistente, noch von der Referenzsequenz besonders divergente Varianten aufkamen, könnten in diesem Fall andere Ursachen des Therapieversagens diskutiert werden – etwa Resistenzvermittlung durch Mutationen ausserhalb der RT-Domäne oder wirtsspezifische, zelluläre Faktoren.

## Patient 7

### Infektion und Verlauf

Es bestand eine Infektion mit Genotyp D, Serotyp ayw3; weiterhin lag ein negativer HBe-Status vor. Dieser 41-jährige Mann wurde insgesamt 20 Monate mit Adefovir behandelt.

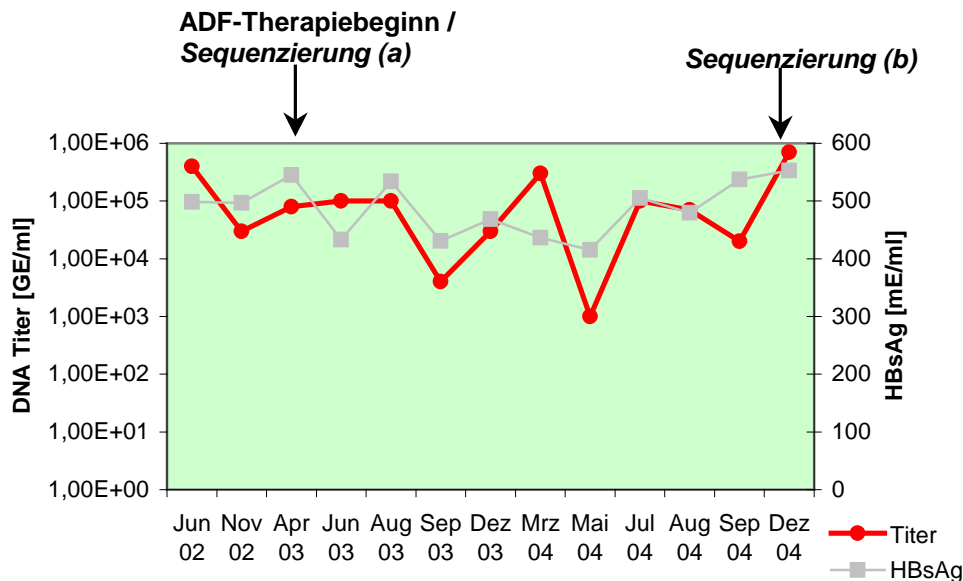


Abb. 3.17 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 7. Die Dokumentation begann 10 Monate vor der ersten Adefovirgabe. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 20 Monate.

Der Behandlung mit Adefovir ging eine Lamivudintherapie unmittelbar voraus. Zu Beginn der ADF-Therapie betrug der virale Titer  $10^5$  GE/ml. Während des Beobachtungszeitraumes kam es zu starken Schwankungen der Virämie. Ein halbes Jahr nach Therapiebeginn lag der Titer zwischen  $10^3$  und  $10^4$  GE/ml. 6 Monate später erreichte er  $10^5$  GE/ml, 2 Monate später fiel er um über 2 Logstufen und stieg nach 2 Monaten wiederum auf  $10^5$  GE/ml an.

In den letzten 3 Monaten vor der zweiten Sequenzierung wurde nach einem zuvorgehenden leichten Abwärtstrend ein erneuter Titeranstieg um fast 2 Logstufen beobachtet. Mit  $10^6$  GE/ml lag dieser damit weit über der Nachweisgrenze, es konnte also ein Therapieversagen definiert werden. Der HBsAg-Titer blieb zwischen 400 und 600 mE/ml während des Beobachtungszeitraumes relativ konstant.

Im Allgemeinen kommen Schwankungen der Viruslast um 1-2 Logstufen bei HBV-Patienten nicht selten vor und stellen wohl ein natürliches Phänomen der chronischen Hepatitis B Infektion dar [106]. Dennoch fiel das deutliche auf und ab der Virämie bei diesem Patienten besonders ins Auge.

### Sequenzierung der Klone

Durch die Sequenzierung der RT-Domäne der klonierten DNA konnten folgende Mutationen nachgewiesen werden:

Patient 7								
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)				Nach 20 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 4	Klon 11	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	Klon 13
S 21 A	S 21 A					H 35 R		
A 38 E	A 38 E							G 127 R
Y 54 H	Y 54 H							
			T 70 A					
L 91 I	L 91 I							
L 122 I	L 122 I							
N 124 Y	N 124 Y							
P 130 Q	P 130 Q							
D 131 N	D 131 N							
Y 135 S	Y 135 S							
	Q 149 K							
L 180 M	L 180 M							
T 184 S	T 184 S							
M 204 I	M 204 I							
N 248 H	N 248 H							
C 256 G	C 256 G							
Y 257 C								
E 263 D	E 263 D							
I 278 V	I 278 V							
M 309 K	M 309 K							
			K 328 R					

Tab. 3.7 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 7 – vor und 20 Monate nach Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 20-monatiger Adefovir-Behandlung bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.



Trotz einer vorhergehenden Therapie mit Lamivudin konnten bei den Klonen 4(a) und 11(a) keine bekannten Resistenzmutationen in der RT-Domäne nachgewiesen werden. Bei den Klonen 1(a) und 2(a) fand sich das charakteristische rtM204I / rtL180M - Muster. Nach 20 Monaten ADF-Behandlung waren diese Mutationen bei keinem der untersuchten Klone mehr nachweisbar. Bis auf 2 einzelnen Mutationen bei 2 Klonen entspricht die virale Population zu diesem Zeitpunkt auf Aminosäureebene der RT-Domäne des HBV-Referenztyps (Wildtyp).

## Phylogenie

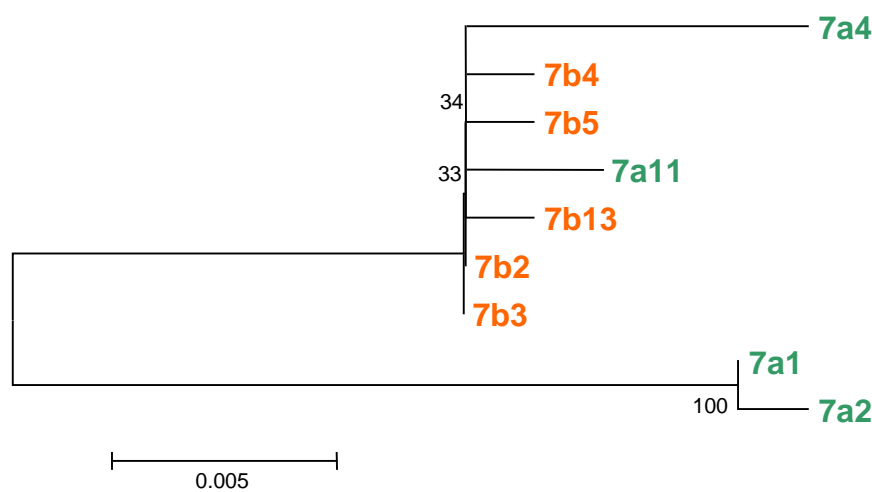


Abb. 3.18 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 7. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 7a: Klone von Patient 7 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 7b: Klone von Patient 7 nach 20 Monaten unter ADF-Therapie

Obwohl alle untersuchten Klone vor ADF-Therapiebeginn den gleichen Geno- und Serotyp aufwiesen, schienen zwei verschiedene Subpopulationen vorzuherrschen (Klone 1(a) und 2(a) versus Klone 4(a) und 11(a) (s. Tab.3.7). Dies wird durch die phylogenetischen Analysen bestätigt, allerdings können die Verwandtschaften zwischen den restlichen Klonen am Baum nicht gut aufgelöst werden, signifikant bleibt nur die Abspaltung der Klone 1(a) und 2(a) gegenüber allen anderen. Aus dem phylogenetischen Netzwerk (Abb. 3.42, S.124) geht hervor, dass die nach 20 Monaten ADF-Therapie untersuchten Klone sich einen gemeinsamen Vorfahren, Klon 4 (a), teilten. Es schien also, als hätte sich unter ADF-Therapie eine bereits bestehende (Klon 4(a) und 11(a)) Population weiterentwickelt, ohne dass eine neue selektioniert worden wäre. Die initial vorhandene, durch die Klone 1 und 2 (a) repräsentierte, Population konnte nach 20 Monaten nicht mehr nachgewiesen werden. Durch die geringe Anzahl an untersuchten

Klonen waren keine quantitative Aussagen über den Anteil verschiedener Subpopulationen am gesamten viralen Genpool möglich. Da alle 5 untersuchten (b) - Klone dem Anschein nach einer Quasispezies angehörten, bestand jedoch eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um die Majorpopulation handelte.

In keinem der nach 20 Monaten Adefovirtherapie untersuchten Klone konnten bekannte, mit Adefovirresistenz assoziierte Mutationen der RT-Domäne nachgewiesen werden. Die Selektion einer Resistenz-vermittelnden Mutation würde ein rasches Überwiegen dieser Variante in der Majorpopulation vermuten lassen, dafür gibt es hier keine Hinweise. Es bestanden kaum Abweichungen gegenüber der RT-Domäne der Referenz- bzw. Wildtypsequenz, bei der Adefovirsensitivität besteht. Auch bei diesem Patienten schien demnach ein Resistenzmechanismus vorzuliegen, der nicht auf Mutationen in der HBV-RT-Polymerase zurückzuführen war.

## **Patient 8**

### Infektion und Verlauf

---

Es lag eine Infektion mit Genotyp A, Serotyp adw3, vor; auch bei dieser 47-jährigen Patientin schloss sich die Adefovirtherapie direkt an eine vorhergehende Behandlung mit Lamivudin an.

Nach ADF-Therapiebeginn kam es zunächst zu einem steilen Abfall der Viruslast von  $10^8$  GE/ml auf  $10^4$  GE/ml. Im Verlauf der Therapie stieg der HBV-DNA-Titer dann wieder bis auf  $10^5$  GE/ml an. Die Virusreplikation konnte durch Adefovir scheinbar unterdrückt werden, dennoch gelang es nicht, die Viruslast unter die Nachweisgrenze zu senken. Die HBsAg-Spiegel lagen im Mittel um 420 mE/ml. Die Adefovirtherapie wurde bis zum Ende des Beobachtungszeitraums fortgesetzt, der Titer blieb zwischen  $10^4$  GE/ml und  $10^5$  GE/ml über zwei Jahre relativ konstant.

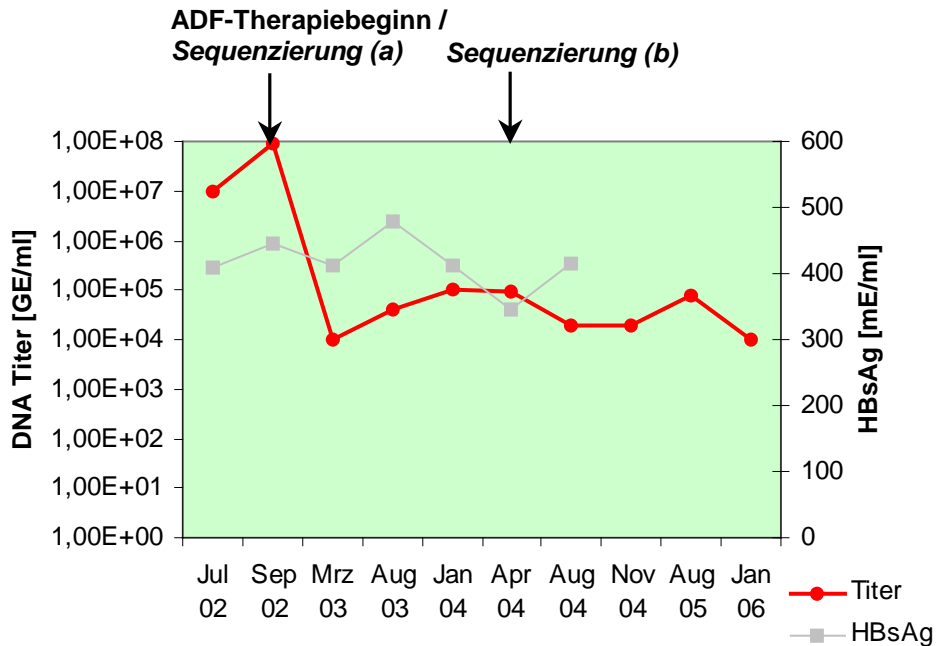


Abb. 3.19 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 8. Die Dokumentation begann zwei Monate vor Durchführung der Adefovirtherapie und wurde bis Januar 2006 weitergeführt. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. HBsAg-Werte lagen nur bis einschließlich April 2004 vor. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 19 Monate.

## Sequenzierung der Klone

Alle untersuchten Klone zum Zeitpunkt 0 (vor ADF-Therapiebeginn) wiesen bekannte Lamivudinresistenz-Mutationen auf (rtL180M, rtM204V und rtV173L). Diese Mutationen persistierten auch noch zwei Jahre nach Ende der Lamivudintherapie, lediglich bei einem von vier Klonen bestand ein regelrechtes YMDD-Motiv.

Zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung fanden sich bei keinem Klon Mutationen, die in einem bekannten Zusammenhang mit Adefovirresistenz stehen.

Auffällig war, dass bei 100% der Klone nach 19-monatiger Adefovirtherapie die Mutation rtV173L detektierbar war, obwohl sie zum Zeitpunkt 0 nur bei einem einzigen Klon vorkam. Diese Mutation tritt in der Regel zusammen mit einem veränderten YMDD-Motiv bei Lamivudinresistenz auf. Die Sensibilität des Virus gegenüber Adefovir wird durch ihr Vorhandensein nicht verändert [107].

Patient 8							
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)				Nach 19 Monaten (b)			
Klon 1	Klon 3	Klon 4	Klon 5	Klon 2	Klon 5	Klon 8	Klon 31
	I 53 S V 56 M	I 53 S	I 53 S				F 28 L
I 112 T				H 35 R		I 53 S	
S 135 Y	S 135 Y	S 135 Y	S 135 Y	S 135 F	S 135 F	S 135 F	S 135 F
V 142 I	V 142 I	V 142 I	V 142 I	V 142 I	V 142 I	V 142 I	V 142 I
		V 173 L		V 173 L	V 173 L	V 173 L	V 173 L
L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 T	L 180 M	L 180 M	L 180 M
M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V		L 204 V	M 204 V
V 207 I				S 219 A	S 219 A	S 219 A	S 219 A
S 219 A	S 219 A	S 219 A	S 219 A	N 337 H		N 337 H	N 337 T
L 229 V	L 229 V						

Tab. 3.8 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 8 – vor und 19 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 19 Monaten unter ADF-Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

## Phylogenie

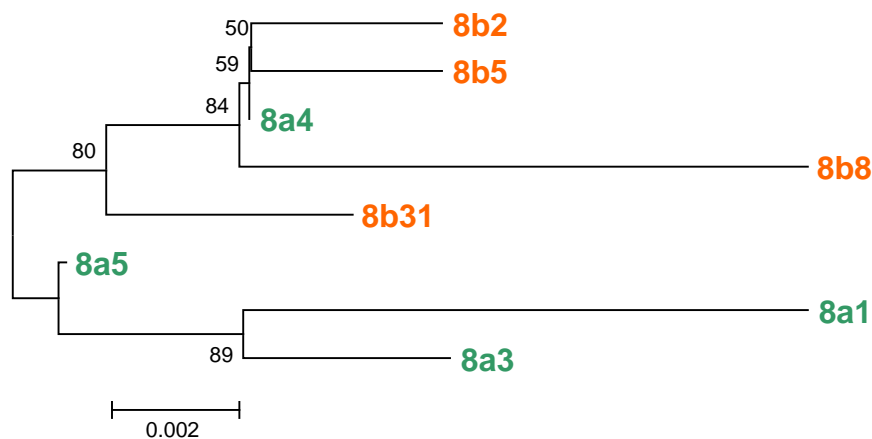


Abb. 3.20 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 8. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 8a: Klone von Patient 8 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 8b: Klone von Patient 8 nach 19 Monaten unter ADF-Therapie

Die phylogenetische Analyse ließ vermuten, dass Klon 4 (a) der Population entstammt, aus der sich alle (b)-Klone entwickelten, die Klone 2 und 5 (b) schienen unmittelbar aus ihr hervorgegangen zu sein. Klon 4 (a) bildete als einziger (a)-Klon ein *Cluster* mit allen anderen (b)-Klonen; die Aufteilung der verschiedenen Klone in zwei Hauptgruppen blieb dennoch unverkennbar. Diese Verwandtschaftsbeziehungen verdeutlichte auch das Vorkommen der Mutation rtV173L bei allen untersuchten (b)-Klonen: Klon 4 (a) war der einzige Klon, der auch schon zum Zeitpunkt 0 diese Mutation aufwies. Es musste beachtet werden, dass gleichzeitig auch die Lamivudinresistenzmutation rtM204V, zusammen mit rtL180M, nach ADF-Therapie nachweisbar blieb. Eine Möglichkeit könnte sein, dass durch die Kombination aus rtV173L und rtL180M in diesem Fall die Replikationseffizienz noch stärker optimiert wurde als durch das alleinige Vorkommen von rtL180M und dass sich daraus die Persistenz der Genomvariante von Klon 4 (a) erklärt. Bei diesem Patienten kam unter ADF-Therapie demnach wahrscheinlich keine neue HBV-Population auf, sondern eine bestehende Subpopulation entwickelte sich weiter.

Unter Adefovir konnte bei diesem Patienten kein überzeugender Therapieerfolg erzielt werden, die Viruslast blieb über der Nachweisgrenze. Gleichzeitig sank der Titer aber auch insgesamt um drei Logstufen und überstieg während 19 Monaten ADF-Therapie nie  $10^5$  GE/ml. Ob hier ein moderat resistentes Virus vorlag oder ob immunologische oder zelluläre Faktoren einen zufriedenstellenden Therapieerfolg verhinderten, blieb ungeklärt. Nach 19 Monaten Adefovirtherapie fanden sich in keinem der untersuchten Klone bekannte Resistenzmutationen gegen dieses Nukleotidanalogen, dafür allerdings viele andere, bisher noch nicht untersuchte RT-Domänen-Mutationen. Ob eine einzelne dieser Mutationen oder die Kombination aus mehreren eine Resistenz gegen Adefovir vermitteln konnte, muss noch untersucht werden. Allerdings lagen alle bisher bekannten Resistenzmutationen in konservierten Regionen der RT-Domäne, während die hier gefundenen Mutationen in erster Linie innerhalb der variablen Regionen nachweisbar waren.

## Patient 9

### Infektion und Verlauf

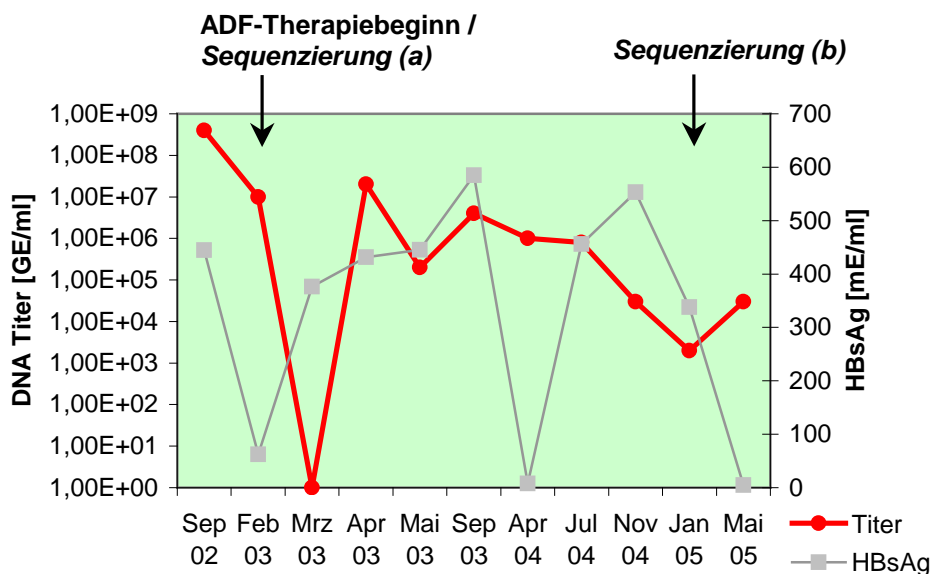


Abb. 3.21 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 9. Die Dokumentation begann fünf Monate vor Durchführung der Adefovirtherapie und wurde 28 weitere Monate fortgesetzt. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Nach Gabe von HB-Immunglobulinen zu verschiedenen Zeitpunkten sanken die HBsAg-Werte jeweils kurzfristig unter die Nachweisgrenze. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 24 Monate.

Es handelte sich um einen 44-jährigen, lebertransplantierten Patienten. Um eine Re-Infektion der neuen Leber zu vermeiden, wurde er mehrmals passiv mit Hepatitis B Immunglobulinen gegen HBV immunisiert (Hepatect<sup>®</sup>; Biotest Pharma, Deutschland), wodurch es zu starken Schwankungen in HBsAg kam.

Die HBV-Infektion bestand bei diesem Mann mit Genotyp A, Serotyp adw2. Bis unmittelbar zu Beginn der Adefovirtherapie wurde er mit Lamivudin behandelt. Unter Adefovir kam es zum Absinken des HBV-Titers um insgesamt vier Logstufen. Im März ergab die HBV-DNA Bestimmung einen Wert unter der Nachweisgrenze. Da der HBV-Titer im Februar und April 2003 bei  $10^7$  GE/ml lag, handelte es sich bei der Titerbestimmung im März 2003 wahrscheinlich um ein Artefakt. Insgesamt folgte die Virämie einem Abwärtstrend, zwei Monate nach Therapiebeginn lag sie bei  $10^7$  GE/ml und sank dann im Laufe von 2 Jahren bis unter  $10^4$  GE/ml. Auch hier war also eine deutliche Wirkung der ADF-Therapie zu beobachten, unter die Nachweisgrenze konnte die Viruslast dennoch nicht abgesenkt werden. Die starken Schwankungen des HBsAg-Spiegels hingegen entsprachen jeweils den Zeitpunkten der passiven Immunisierung mit HB-

Immunoglobulinen. Zwischendurch erreichte der HBsAg-Spiegel mit bis zu 600 mE/ml wieder hohe Werte.

Die Therapie mit Adefovir wurde bis einschließlich Mai 2005 fortgeführt.

### Sequenzierung der Klone

Patient 9									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 24 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 4	Klon 6	Klon 7	Klon 7	Klon 10	Klon 11	Klon 13	Klon 15
V 27 A				R 15 G	A 21 S	A 21 S V 23 G		A 21 S	A 21 S
	S 47 P L 80 V				I 121 V	124 del			
M 45 L	M 45 L	M 45 L M 204 I	M 45 L M 204 I	M 45 L M 204 I	M 146 L	M 146 L F 295 L	M 146 L	M 146 L	M 146 L
Y 339 N									

Tab. 3.9 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 9 – vor und 2 Jahre nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 2 Jahren Adefovir-Behandlung bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.  
Del: Deletion eines Codons → fehlende Aminosäure

Zum Zeitpunkt 0 wiesen drei Klone ein YIDD-Motiv (rt204I) auf, bei den restlichen zwei Klonen lag ein unverändertes YMDD-Motiv vor. Im Allgemeinen beobachtete man ein gehäuftes Auftreten von rtM204I eher bei Genotyp D HBV-Stämmen, während sich rtM204V in erster Linie bei Genotyp A findet [108].

Zusätzlich zu rtM204I traten bei diesem Patienten keine kompensatorischen Mutationen auf.

Nach zwei Jahren ADF-Therapie fanden sich keine bekannten Resistenzmutationen in der viralen Population. Insgesamt variierte die Sequenz der RT-Domäne bei einem Großteil der untersuchten Klone nur geringfügig. Wie auch bei Patient 8 war hier die Frage gerechtfertigt, warum die Virämie trotz des Fehlens von bekannten Adefovirresistenzmutationen in der HBV-Majorpopulation nicht unter die Nachweisgrenze gesenkt werden konnte.

## Phylogenie

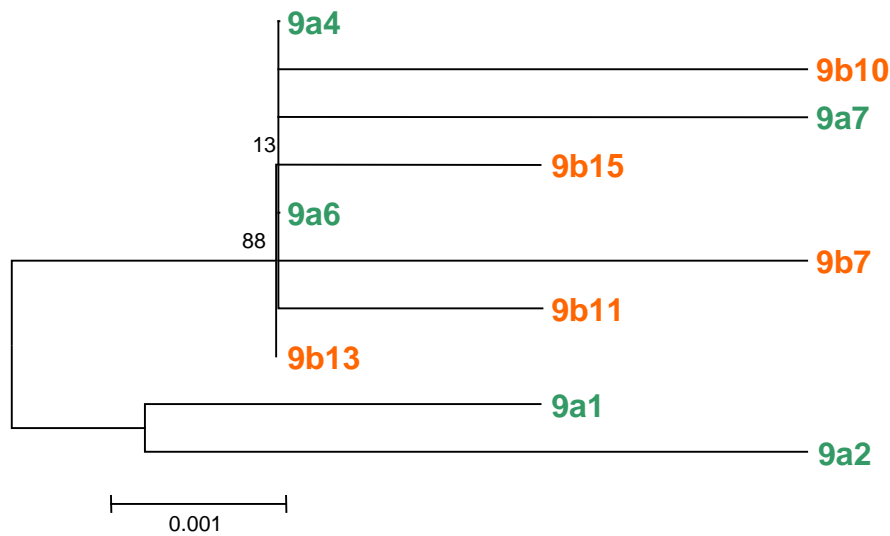


Abb. 3.22 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 9. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 9a: Klone von Patient 9 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 9b: Klone von Patient 9 nach 2 Jahren unter ADF-Therapie

Eine phylogenetische Einteilung der Klone in zwei Gruppen, vor (a) und 2 Jahre nach Beginn der ADF-Behandlung (b), gelang nicht, (a) und (b) Klone ließen sich nicht auftrennen. Lediglich die Klone 1 und 2 (a) konnten allen anderen Klonen gegenüber gestellt werden. (a)- und (b)-Klone entwickelten sich beide gleichermaßen von einer gemeinsamen Vorfahr-Sequenz aus; es schien also keine völlig neue HBV-Population im Laufe der Therapie aufgekommen zu sein.

Klon 10 (b) wies an Position 124 der RT-Domäne eine Aminosäuredeletion auf. Auch bei den Viruspopulationen anderer Patienten fanden sich in dieser Region der RT-Domäne (Position rt122 - rt135) auffallend viele Variationen, in einem Fall sogar eine Insertion von drei Aminosäuren (s.Tab. 3.19). Auf Aminosäureebene ergab sich bei diesem Patienten folgendes Bild (Vergleich mit Klon 15 (b), repräsentativ für die majore Viruspopulation nach 24 Monaten Adefovirtherapie; Ref A: Wildtyp/Referenz, Genotyp A:

```

rt115
Ref A      LSSNSRINNNQYGTMQNLHDSCS
9b15      LSSNSRINNNQYGTMQNLHDSCS
9b10      LSSNSRINN-QYGTMQNLHDSCS
          *****_*****

```

Entsprechend dazu konnte bei diesem Klon eine Aminosäuredeletion an Position 113 des HBs-Gens detektiert werden. Inwiefern dadurch die Funktionalität des HBsAg beeinträchtigt wurde muss noch untersucht werden.



## Patient 10

### Infektion und Verlauf

Auch dieser 47-jährige Patient wurde bis zu Beginn der Adefovirtherapie mit Lamivudin behandelt, es gab kein therapiefreies Intervall. Die Infektion bestand mit HBV Genotyp D (Serotyp ayw3).

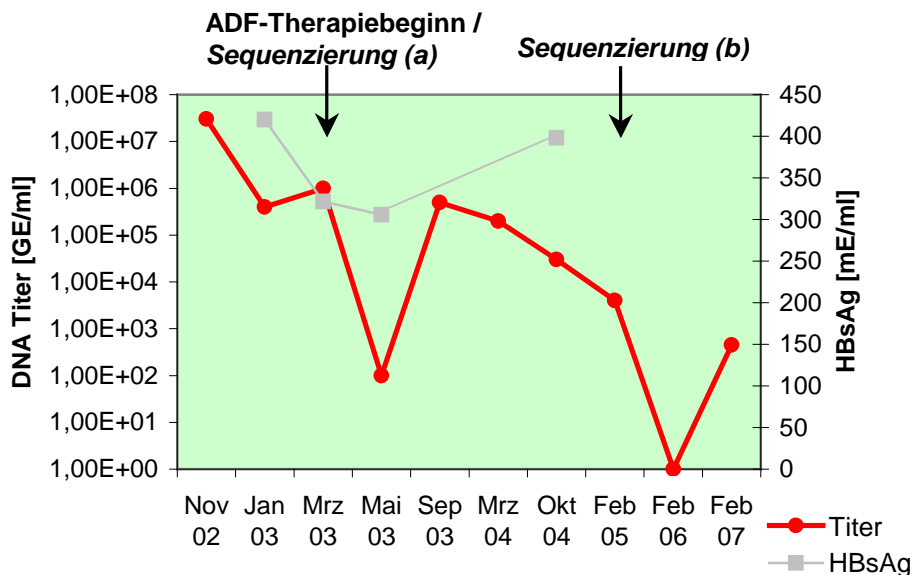


Abb. 3.23 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 10. Die Dokumentation begann vier Monate vor Durchführung der Adefovirtherapie. Nach der zweiten Sequenzierung erfolgten noch zweimal, jeweils im Abstand von einem Jahr, HBV-DNA-Titerkontrollen. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. HBsAg Werte lagen nur bis einschl. Okt. 2004 vor. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 24 Monate.

Unter Therapie mit Adefovir wurden keine großen Schwankungen im HBsAg beobachtet, insgesamt kam es zu einem Anstieg von 300 auf 400 mE/ml nach 18 Monaten.

Zwei Monate nach Beginn der Adefovirtherapie war der HBV-DNA-Titer um vier Logstufen, von zunächst  $10^6$  GE/ml auf  $10^2$  GE/ml gefallen. Da schon vier Monate später fast wieder der Ausgangswert von  $10^6$  GE/ml erreicht wurde, handelte es sich hierbei eventuell um einen Artefakt. Ab September 2003 setzte ein Abwärtstrend im HBV-DNA-Titerverlauf ein, insgesamt fiel die Virämie um etwas über 2 Logstufen.

Ein Jahr nach dem zweiten Sequenzierungszeitpunkt lag der HBV-DNA-Titer zum ersten Mal seit Beginn des Beobachtungszeitraumes unter der Nachweisgrenze. Auch im folgenden Jahr blieb die Viruslast mit 450 GE/ml weiterhin niedrig.

## Sequenzierung der Klone

Zum Zeitpunkt 0 (vor ADF-Therapie) wiesen alle untersuchten Klone das typische Lamivudin-Resistenzmuster rtM204V / rtL180M / rtV173L auf; die zusätzlich nachweisbaren Mutationen wurden bisher nicht mit Resistenzvermittlung in Zusammenhang gebracht.

Patient 10									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 24 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 4	Klon 6	Klon 7	Klon 2	Klon 4	Klon 5	Klon 11	Klon 12
	N 123 S		I 162 F	V 27 A		L 69 P		V 23 G	S 21 C
V 173 L	V 173 L	V 173 L	V 173 L P 177 L	V 173 L				L 82 R W 243 R	
L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M					
M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V					
V 224 I	V 224 I	V 224 I	V 224 I I 226 M	V 224 I					

Tab. 3.10 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 10 – vor und 24 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 2 Jahren ADF-Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Nach 2-jähriger Adefovirtherapie befanden sich unter den fünf untersuchten Klonen keine bekannten Lamivudin-Resistenzmutanten mehr, stattdessen dominierte eine veränderte, in ihrer RT-Domäne zugunsten der HBV-Referenz-Sequenz entwickelte Population.

## Phylogenie

Der phylogenetische Baum zeigte die Divergenz der viralen Populationen vor und nach 2 Jahren ADF-Therapie. Die Sequenzen ließen sich leicht in zwei Gruppen einordnen, dabei schien die (a)-Population ihren Ursprung in der von Klon 1 repräsentierten Subpopulation genommen zu haben. Nach 2 Jahren ADF-Therapie ließ sich eine phylogenetisch neue, bzw. bisher nicht detektierte HBV-Population nachweisen. Erstaunlicherweise wiesen die

untersuchten Klone nach 2 Jahren Adefovirtherapie insgesamt nur sehr wenig Mutationen innerhalb der RT-Domäne auf.

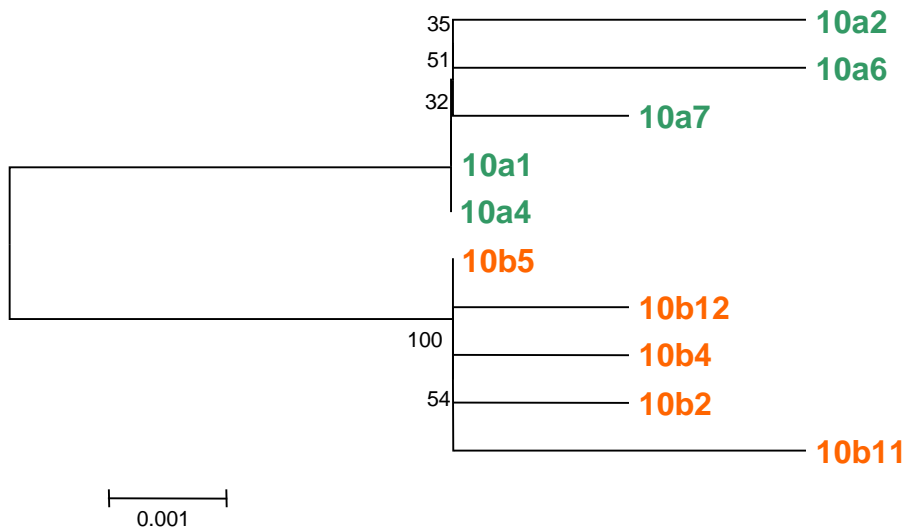


Abb. 3.24 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 10. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 10a: Klone von Patient 10 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 10b: Klone von Patient 10 nach 24 Monaten unter ADF-Therapie

## Patient 11

### Infektion und Verlauf

Es lag eine Infektion mit HBV Genotyp D, Serotyp ayw vor. Gleichzeitig bestand bei diesem 38-jährigen Patienten ein negativer HBeAg-Status. Vor Beginn der insgesamt 31-monatigen Adefovirtherapie war keine andere antivirale Therapie mit Nucleosidanaloga durchgeführt worden.

Von allen untersuchten Patienten konnte allein bei diesem ein länger bestehender Therapieerfolg vermerkt werden. Über mehrere Termine hinweg blieb der Nachweis von HBV-DNA im Serum erfolglos, das HBsAg fiel im Verlauf von 540 auf 430 mE/ml und sank schließlich nach 31 Monaten ADF-Therapie – bemerkenswerterweise zeitgleich mit dem Wiederanstieg der Virämie – unter die Nachweisgrenze ab. Erst 20 Monate nach Beginn der ADF-Therapie stieg der HBV-DNA-Titer wieder an, zunächst nur minimal, auf 100 GE/ml, drei Monate später aber sprunghaft auf über  $10^6$  GE/ml. Kurz vor dem Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung kam es erneut zu einem Abfall, auf  $10^4$  GE/ml, zwei Monate später lag der Titer bei 5000 GE/ml.

Dieser Patient wurde bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes mit Adefovir behandelt, Ende 2005 wurde die Umstellung auf Tenofovir empfohlen.

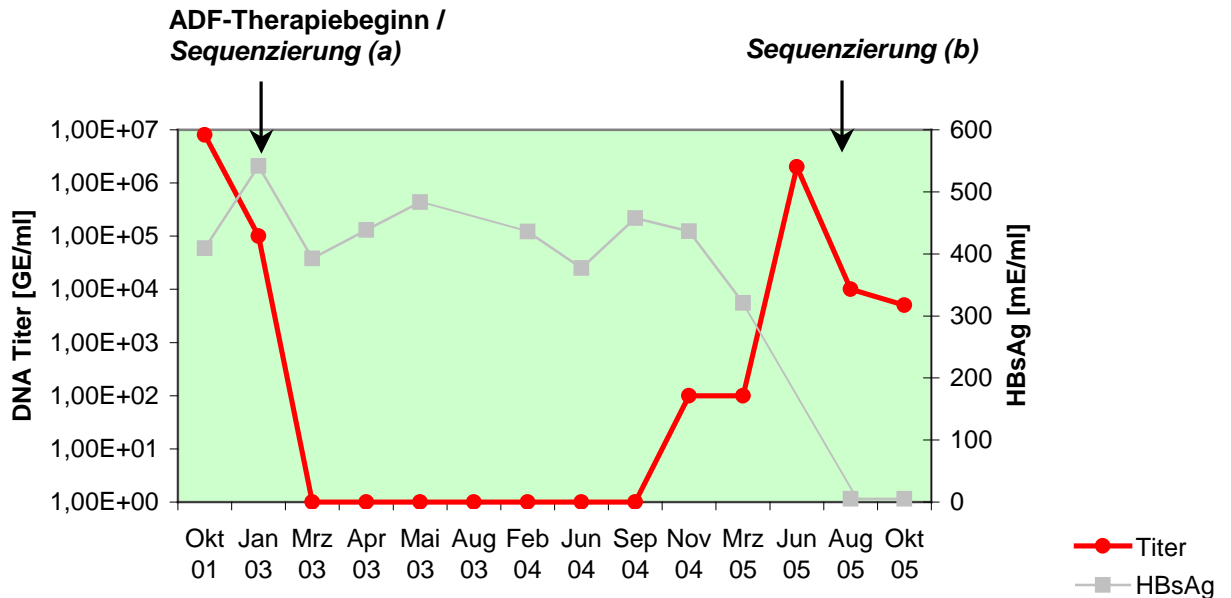


Abb. 3.25 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 11. 15 Monate vor Beginn der Adefovirtherapie wurde die erste HBsAg- und Titerbestimmung durchgeführt, die letzte erfolgte 4 Jahre später. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 31 Monate.

Über fast zwei Jahre hinweg demonstriert dieser Patient anschaulich die Möglichkeit und Auswirkungen einer erfolgreichen antiviralen Therapie.

## Sequenzierung der Klone

Patient 11									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 31 Monaten (b)				
Klon 2	Klon 22	Klon 23	Klon 24	Klon 25	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 42	Klon 43
S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A
			N 53 S		T 24 A				
				K 60 R	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F
			R 120 G		N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H
L 122 F	L 122 F		L 122 F	L 122 F	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q
N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N
P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q		D 134 N			
D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S
	L 132 P						L 155 S		
Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	N 236 T	N 236 T	N 236 T	N 236 T	N 236 T
				C 136 R	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H
		V 142 G				Y 252 H			
L 179 P					E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D
		I 233 T			I 226 R	I 226 R	I 226 R	I 226 R	I 226 R
N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V
C 256 S	C 256 S	C 256 S	C 256 S	C 256 S					T 326 I
E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	A 329 T	A 329 T	A 329 T	A 329 T	A 329 T
I 266 K	I 266 K	I 266 K	I 266 K	I 266 K					
I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V					
S 317 A	S 317 A		S 317 A	S 317 A					
A 329 T	A 329 T	A 329 T	A 329 T	A 329 T					
		L 336 T							

Tab. 3.11 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 11 – vor und 31 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die 31 Monaten ADF-Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Wie bei einem Lamivudin-naiven Patienten erwartet, fanden sich zunächst keine typischen, bekannten Resistenzmutationen. Im Verlauf der Adefovirbehandlung verschwanden einige einzelne Mutationen, die virale Population wurde etwas insgesamt homogener. Bei Klon 23 (a) war initial die Mutation rti233T nachweisbar; ein Isoleucin-zu-Valin-Austausch an dieser Position (rti233V) hätte das Virus sehr wahrscheinlich resistent gegen Adefovir gemacht. Die Mutation rti233T war nach 31 Monaten ADF-Therapie bei

keinem der untersuchten Klone mehr nachweisbar, was tendenziell gegen eine resistenzvermittelnde Wirkung sprach, diese jedoch nicht ausschloss.

Bei diesem Patienten herrschte eine – im Gegensatz zur HBV-Referenzsequenz – relativ divergente Viruspopulation vor. Auch nach 31-monatiger ADF-Therapie konnten in den variablen Bereichen der RT-Domäne weiterhin viele Substitutionen nachgewiesen werden, diese schienen demnach in der Majorpopulation zu persistieren. Dass bei diesem Patienten über einen längeren Zeitraum Therapieerfolg erzielt wurde, sprach dafür, dass diese – auch bei anderen Patienten nachweisbaren – Substitutionen in den variablen Bereichen der RT-Domäne keine wesentlichen Auswirkungen auf Adefovir-Resistenzvermittlung hatten.

Bei diesem Patienten fand sich in allen 4 untersuchten Klonen nach 31-monatiger ADF-Behandlung die Mutation rtN236T, die eine 4- bis 20-fache Resistenz gegenüber Adefovir vermittelt [109]. Es liegt nahe, dass das Aufkommen dieser Mutation bei diesem Patienten das Ende der erfolgreichen Adefovirtherapie bedeutete: der HBV-DNA-Titer lag kurz vor dem Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung wieder deutlich über der Nachweisgrenze. In diesem Kontext erschien ein relativ spätes Auftreten von rtN236T im Verlauf der Therapie (d.h. erst kurz vor dem Titeranstieg) wahrscheinlich.

Anstelle der zu Beginn der Behandlung vorhandenen Mutation rtI266K konnte nach 31 Monaten ADF-Therapie bei allen Klonen an gleicher Position rtI266R nachgewiesen werden, aber wie auch bei den anderen vorhandenen Mutationen ist hier kein Zusammenhang mit Adefovir-Resistenzvermittlung bekannt.

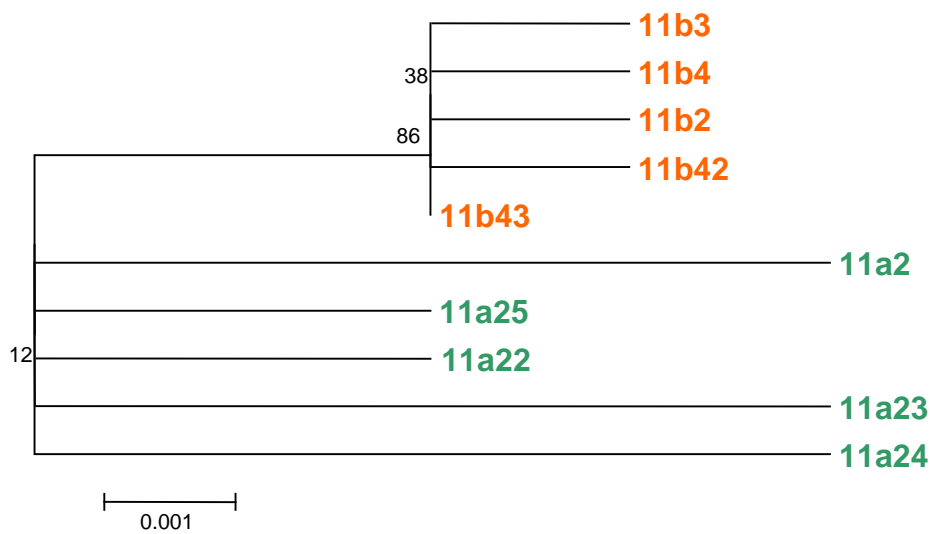


Abb. 3.26 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 11. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 11a: Klone von Patient 11 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 11b: Klone von Patient 11 nach 31-monatiger Behandlung mit Adefovir.

Wie aus Tab. 3.11 hervorgeht, unterschied sich die HBV-Population dieses Patienten genetisch deutlich von der HBV-Referenzsequenz. Dies traf sowohl auf die Viruspopulationen vor als auch nach 31 Monaten Adefovirbehandlung zu. Die deutliche phylogenetische Auftrennung der Klone in zwei Gruppen (a) und (b) verdeutlichte, dass sich die HBV-Populationen im Verlauf der Therapie verändert und weiterentwickelt hatten. Dabei handelte es sich bei den untersuchten (a) –Klonen im Vergleich zu der (b)-Gruppe um eine in sich relativ divergente Population. Die (b)-Klone entwickelten sich anscheinend alle von einem gemeinsamen Vorfahren aus, die Viruspopulation war nach 31 Monaten ADF-Therapie homogener geworden.

## Patient 12

### Infektion und Verlauf

Dieser, mit Genotyp D infizierte 53-jährige Patient, wurde vor Beginn der ADF-Therapie nicht mit Lamivudin behandelt. Zu Anfang der ADF-Therapie lag bei drei HBV-Klonen Serotyp ayw3 vor, Klon 24 (a) entsprach Serotyp ayw. Nach 30 Monaten ADF-Therapie entsprachen alle untersuchten Klone Serotyp ayw.

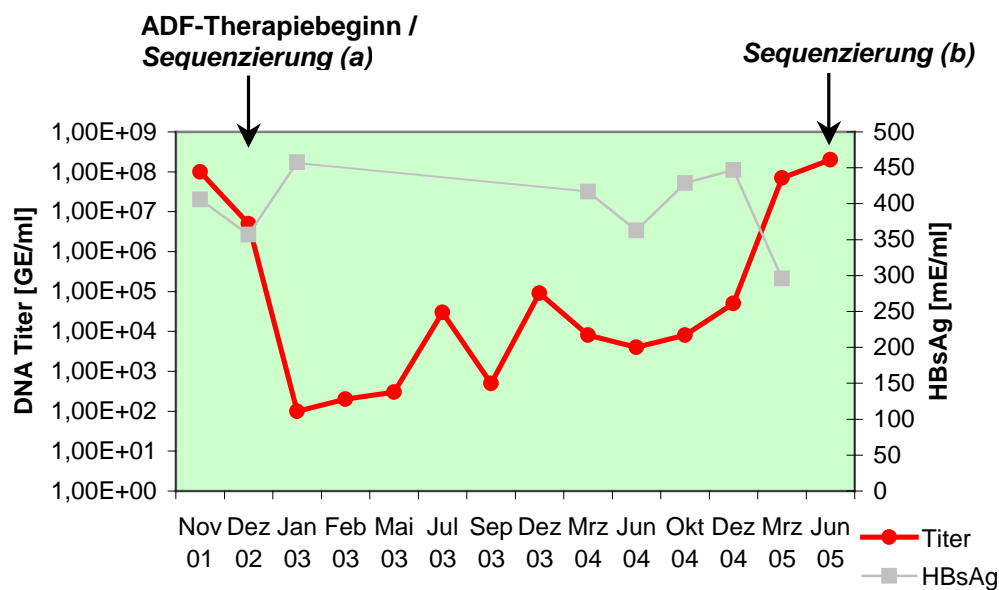


Abb. 3.27 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 12. Die erste HBsAg- und HBV-DNA Titerbestimmung erfolgte ein Jahr vor Beginn der Therapie mit Adefovir. Für Juni 2005 lag kein HBsAg-Wert mehr vor. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 30 Monate.

Unmittelbar nach Beginn der Adefovirtherapie fiel der HBV-DNA-Titer von  $5 \times 10^6$  auf 100 GE/ml. 7 und 12 Monate später stieg die Virämie jeweils kurzzeitig auf  $3 \times 10^4$  und  $9 \times 10^4$  GE/ml an. Danach folgte die Entwicklung der Viruslast einem Aufwärtstrend, der Titer stieg kontinuierlich an, schließlich sprunghaft auf über  $10^7$  GE/ml. Als die ADF-Behandlung nach 30 Monaten beendet wurde, lag die Viruslast bei  $10^8$  GE/ml. Im Anschluß an die Adefovirbehandlung erhielt dieser Patient Lamivudin, ein Jahr später erfolgte die Umstellung auf Entecavir.

Der HBsAg-Spiegel bewegte sich während des Beobachtungszeitraumes im Bereich zwischen 350 und 450 mE/ml und blieb auch in Zeiten niedriger Virämie auf dieser Ebene konstant. Erst nach mehr als 2 Jahren ADF-Therapie, parallel zu dem starken Anstieg der



Viruslast um drei Logstufen, fiel der HBsAg-Spiegel geringfügig auf 300 mE/ml. Dieser Patient schien zuerst auf die ADF-Therapie anzusprechen, der Titer fiel fast bis auf die Nachweisgrenze. Nach wenigen Monaten nahm die HBV-Replikation wieder zu, so dass es zu einem fast exponentiellen Anstieg der Virämie und damit zum Therapieversagen kam.

### Sequenzierung der Klone

Patient 12								
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)				Nach 30 Monaten (b)				
Klon 2	Klon 3	Klon 23	Klon 24	Klon 2	Klon 5	Klon 41	Klon 42	Klon 43
S 21 A	S 21 A	S 21 A		S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A
	F 88 S				N 53 D	N 53 D	N 53 D	N 53 D
A 113 G				Y 54 H	Y 54 H	Y 54 H	Y 54 H	Y 54 H
L 122 F	L 122 F	L 122 F		L 115 V	L 115 V	L 115 V	L 115 V	L 115 V
N 124 Y	N 124 Y	N 124 Y		L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F	L 122 F
P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q		N 124 Y	N 124 Y	N 124 Y	N 124 Y	N 124 Y
D 131 N	D 131 N	D 131 N		P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q	P 130 Q
Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S		D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N
V 142 A				Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S
V 191 I				A 181 V	A 181 V	A 181 V	A 181 V	A 181 V
			N 236 T		P 196 S			
N 248 H	N 248 H	N 248 H		F 221 C				
	C 256 S				N 236 T	N 236 T	N 236 T	N 236 T
E 263 D	E 263 D	E 263 D				N 238 H		
		I 269 L		N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H	N 248 H
I 278 V	I 278 V	I 278 V			C 256 S	C 256 S	C 256 S	C 256 S
				E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D	E 263 D
								K 275 R
				I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V
				M 309 K				

Tab. 3.12 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 12 – vor und 30 Monate nach Beginn der Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die 30 Monaten ADF-Therapie bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Bereits vor ADF-Therapiebeginn existierten mindestens zwei unterschiedliche Viruspopulationen. Drei Klone ähnelten einander in ihrem Mutationsmuster; während in der RT-Domäne von Klon 24 (a) nur eine einzige Abweichung von der Referenzsequenz vorlag – rtN236T, eine natürlich vorkommende Adefovir-Resistenzmutation.

Nach 30 Monaten ADF-Therapie war bei einem Klon – in unmittelbarer Nähe der Resistenzmutante rtN236T – die Mutation rtN238H nachweisbar. Die Regionen, in denen resistenzvermittelnde Mutationen liegen, gehören in der Regel zu den konservierten Bereichen der RT-Domäne und Veränderungen an diesen Stellen führen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu einer herabgesetzten Sensitivität des Virus gegenüber einem Nukleosidanalogen. Aus diesem Grund verdiente die Mutation rtN238T unter dem Aspekt der potentiellen Resistenzvermittlung besondere Aufmerksamkeit. Das Auftreten dieser Mutation wurde unter ADF-Therapie allerdings nicht oft beobachtet; ein Zusammenhang mit Adefovirresistenz ist bisher nicht nachgewiesen.

## Phylogenie

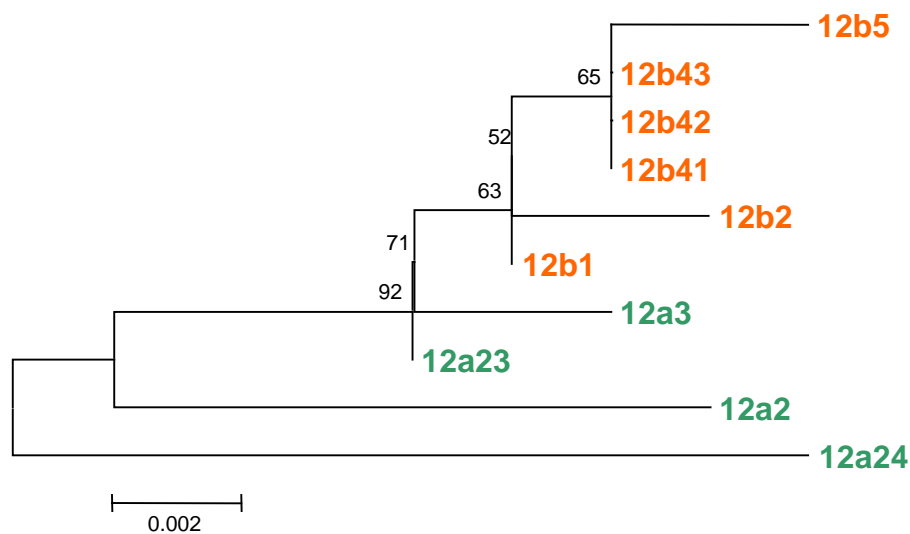


Abb. 3.28 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 12. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 12a: Klone von Patient 12 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 12b: Klone von Patient 12 nach 30-monatiger Adefovirtherapie

Nach 30 Monaten Adefovirtherapie fand sich die Mutation rtN236T in vier von fünf untersuchten Klonen. Diese Mutation kam vor ADF-Therapiebeginn nur bei Klon 24 (a) vor. Von allen zum Zeitpunkt 0 untersuchten war dieser Klon wahrscheinlich der einzige, der bereits Adefovirresistenz besaß. Im phylogenetischen Netzwerk stellen sich (a) und

(b) Klone als getrennte Gruppen dar. Klon 24 (a) vertrat wahrscheinlich eine eigene Quasispezies. Dieser Klon wies keine phylogenetische Beziehung zu der Gruppe der (b)-Klone auf, es wirkte zunächst nicht so, als hätten sich die (b)-Klone aus der Klon 24 (a)-Population entwickelt. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Mutation rtN236T unter ADF-Therapie in der (b)- Population neu selektioniert wurde.

Die neue Selektion der Mutation rtN236T könnte das späte, erst über ein Jahr nach Behandlungsbeginn eingetretene Therapieversagen erklären. Eine bereits vorhandene resistente Virusvariante würde sich wahrscheinlich wesentlich schneller in einem Wirt durchsetzen. Die frühe Persistenz der Mutation rtN236T in der Majorpopulation des Virus wäre mit dem initialen Therapieansprechen auf Adefovir allerdings schwer vereinbar gewesen.

Eine weitere bekannte Adefovirresistenzmutation, rtA181V, ließ sich nach 30-monatiger ADF-Therapie in allen untersuchten Klonen nachweisen. In der viralen Majorpopulation dieses Patienten fanden sich also zwei bekannte Adefovirresistenz-vermittelnde Mutationen, es schien sich demnach um ein hochresistentes Virus zu handeln. Diese Mutationen müssen zum überwiegenden Anteil im späteren Verlauf der antiviralen Therapie selektioniert worden sein, da der initiale Therapieerfolg sonst wahrscheinlich nicht erst möglich gewesen wäre.

Auffällig in der Entwicklung der (b)-Gruppe war der Wechsel des Serotyps, der sich im Laufe der ADF-Therapie vollzog. Bis auf Klon 24 (a) mit Serotyp ayw entsprachen alle zu Therapiebeginn vorhandenen Klone dem Serotyp ayw3. Nach 30 Monaten Therapie ließ sich bei allen untersuchten Klonen der Serotyp ayw nachweisen, während der Serotyp ayw3 nicht mehr auftrat.

### **Patient 13**

#### Infektion und Verlauf

---

Bei diesem 44-jährigen Mann bestand eine HBV-Infektion mit Genotyp D, Serotyp ayw3. Die Therapie mit Adefovir verlief bei diesem Patienten nicht erfolgreich; der HBV-DNA-Titer konnte nicht unter  $10^7$  GE/ml gesenkt werden.

Dieser Patient war bis zum Beginn der Therapie mit Adefovir im November 2002 noch nicht mit Nukleosidanaloga behandelt worden und war zu diesem Zeitpunkt mit  $10^8$  GE/ml hoch virämisch. Insgesamt wurden innerhalb der 31-monatigen ADF-Therapie nur zweimal HBV-DNA-Titerkontrollen durchgeführt; und zwar in den beiden letzten Monaten vor der zweiten Sequenzierung. Der Titerverlauf konnte demnach über einen großen Zeitraum hinweg nicht beurteilt werden. Unter Adefovir kam es bei diesem Patienten

insgesamt zu einem Abfall der Virämie um eine Logstufe, der Titer blieb mit  $10^7$  GE/ml hoch. Im Gegensatz dazu fiel das HBsAg, das zuvor innerhalb von 10 Monaten von 80 auf über 300 mE/ml gestiegen war, unter Therapie auf 190 mE/ml ab. Im November 2006 wurde dieser Patient auf eine Kombinationstherapie aus Adefovir und Lamivudin umgestellt.

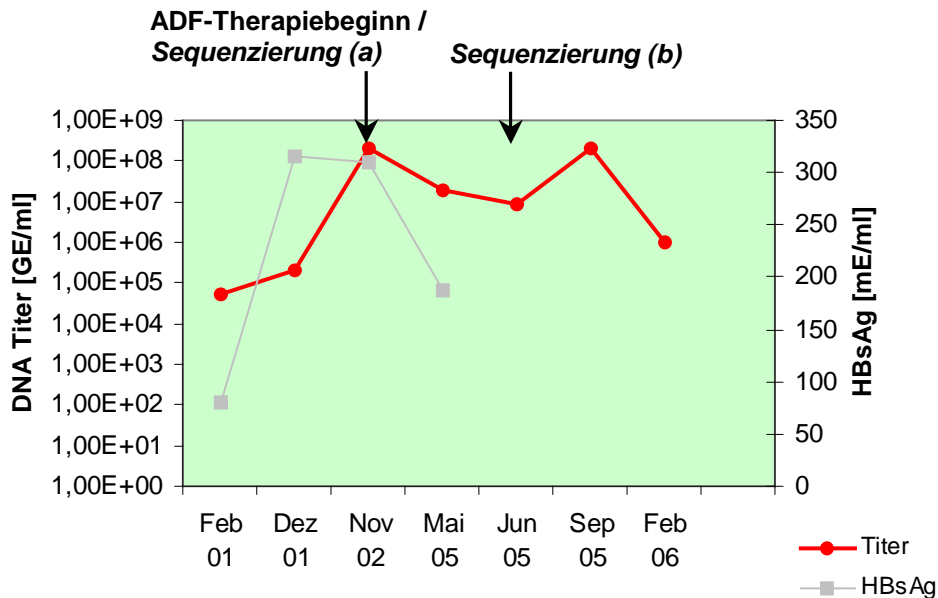


Abb. 3.29 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 13. Die Dokumentation begann 33 Monate vor der ersten Gabe von Adefovir und wurde bis 38 Monate nach deren Beginn fortgeführt. HBsAg-Bestimmung erfolgte nur bis einschl. Mai 2005. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 31 Monate.

### Sequenzierung der Klone

Die RT-Domäne der bei diesem Patienten untersuchten Klone unterschied sich deutlich von der HBV-Referenzsequenz (Genotyp D – HBV-Wildtyp). Vor Beginn der Behandlung mit Adefovir fanden sich bei diesem Patienten keine Resistenzmutationen; zu diesem Zeitpunkt war noch keine antivirale Therapie mit Nukleosidanaloga durchgeführt worden. Zum Beginn der Adefovirbehandlung bestand zwischen den untersuchten Klonen quasi Sequenzhomologie, es war im Prinzip nur eine Majorpopulation nachweisbar. 2,5 Jahre nach Beginn der Therapie hatte sich die virale Population nur unwesentlich verändert. Bei einer in der gesamten Population neu aufgetretenen Mutation handelte es sich um rtA181T, durch die Adefovirresistenz vermittelt wird. Das Aufkommen der Mutation rtA181T könnte eine Erklärung für das Therapieversagen bei diesem Patienten gewesen

sein. Die anderen neu aufgetretenen Mutationen wurden bisher noch nicht mit Resistenzentstehung in Zusammenhang gebracht.

Patient 13									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 31 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 31	Klon 32	Klon 35	Klon 1	Klon 2	Klon 4	Klon 21	Klon 22
S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A	S 21 A
		K 32 Q			T 37 S				
N 53 I	N 53 I	N 53 I	N 53 I	N 53 I					V 44 A
Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S	N 53 I	N 53 I	N 53 I	N 53 I	N 53 I
	L 91 I				Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S	Y 54 S
L 122 I	L 122 I	L 122 I	L 122 I	L 122 I			L 91 I	L 91 I	
N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H				S 117 P	
H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y	L 122 I	L 122 I	L 122 I	L 122 I	L 122 I
M 129 L	M 129 L	M 129 L	M 129 L	M 129 L	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H	N 124 H
D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y	H 126 Y
Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	M 129 L	M 129 L	M 129 L	M 129 L	M 129 L
L 145 M	L 145 M	L 145 M	L 145 M	L 145 M			P 130 S		
Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N	D 131 N
Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S	Y 135 S
L 164 M	L 164 M	L 164 M	L 164 M	L 164 M	L 145 M	L 145 M	L 145 M	L 145 M	L 145 M
F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y	Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F	Y 148 F
A 223 S	A 223 S	A 223 S	A 223 S	A 223 S	Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K	Q 149 K
C 256 S	C 256 S	C 256 S	C 256 S	C 256 S			R 153 Q		
Y257 W	Y257 W	Y257 W	Y257 W	Y257 W	L 164 M	L 164 M	L 164 M	L 164 M	L 164 M
I 266 R	I 266 R	I 266 R	I 266 R	I 266 R	A 181 T	A 181 T	A 181 T	A 181 T	A 181 T
Q267 M	Q267 M	Q267 M	Q267 M	Q267 M	F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y	F 221 Y
E 271 D	E 271 D	E 271 D	E 271 D	E 271 D	A 223 S	A 223 S	A 223 S	A 223 S	A 223 S
I 274 V	I 274 V	I 274 V	I 274 V	I 274 V	C 256 Y	C 256 Y	C 256 Y	C 256 Y	C 256 Y
M 309 I					Y257 W	Y257 W	Y257 W	Y257 W	Y257 W
					I 266 R	I 266 R	I 266 R	I 266 R	I 266 R
					Q267 M	Q267 I	Q267 M	Q267 M	Q267 M
					E 271 D	E 271 D	E 271 D	E 271 D	E 271 D
					I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V	I 278 V
								Q 344 R	

Tab. 3.13 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 13 – vor und 31 Monate nach Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 31 Monaten Adefovir-Behandlung bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

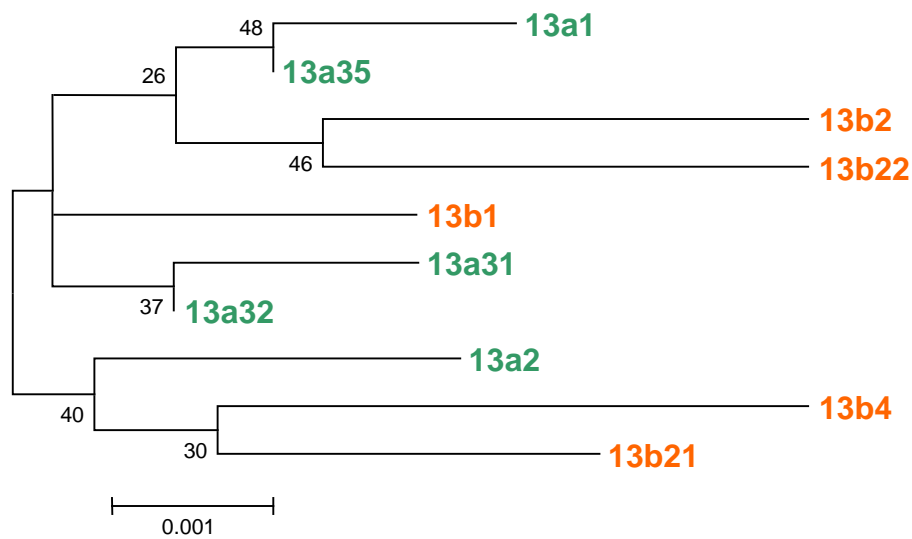


Abb. 3.30 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 13. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 13a: Klone von Patient 13 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 13b: Klone von Patient 13 nach 31 Monaten Behandlung mit Adefovir

Aus der phylogenetischen Analyse wurde ersichtlich, dass sich die virale Population im Laufe der Therapie genetisch weiter von der ursprünglichen Wildtypsequenz entfernte. Eine Auftrennung der Klone in zwei verschiedene Gruppen, vor und nach Adefovirbehandlung, war nicht möglich.

Da nach 31-monatiger ADF-Therapie bei allen untersuchten Klonen die gleichen beiden Mutationen (rtA181T und rtl278V) neu aufgetreten waren und da sich die Klone in der Aminosäuresequenz ihrer RT-Domäne nur wenig unterschieden, war die Entwicklung der (b)-Klone aus einer gemeinsamen Ursprungspopulation wahrscheinlich. Bei diesem Patienten konnte man von viraler Adefovirresistenz ausgehen, wodurch auch die hohe Virämie von über  $10^7$  GE/ml erklärt wurde. Dabei war die HBV-Population in sich vergleichsweise wenig divergent, bis auf die neu erworbene ADF-Resistenzmutation kam es im Verlauf der Therapie zu wenig Sequenzänderungen.

Das Auftreten der Resistenzmutante rtA181T in der HBV-Gesamtpopulation erforderte auch insofern besondere Aufmerksamkeit, als dass diese Mutante in dem (die RT-Domäne überlappenden) HBsAg zu einem Stopp-Codon führte, welches das S-Protein um ca. 1/3 verkürzte. Das Vorhandensein von rtA181T in allen untersuchten Klonen sprach entweder für eine nicht erfasste Minorpopulation mit vollständigem HBs oder dafür,

dass HB Viren mit einem um 300 Basenpaaren verkürzten S-Protein noch replikationsfähig blieben.

## Patient 14

### Infektion und Verlauf

Bei diesem Patienten, einem 38-jährigen Mann, lag vor Beginn der Therapie mit Adefovir bei allen Klonen der seltene HBV-Genotyp G vor.

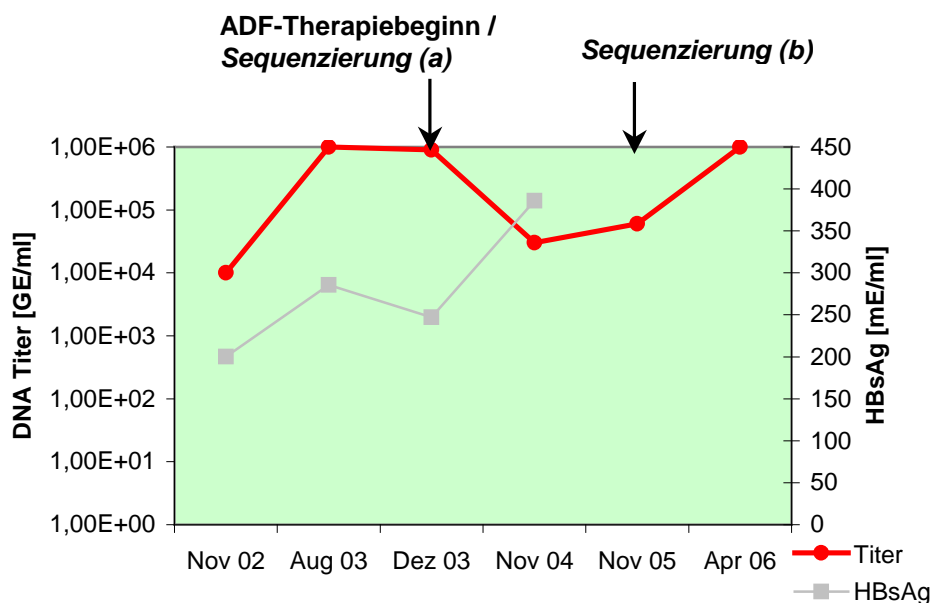


Abb. 3.31 Verlauf von HBsAg und HBV-DNA Titer bei Patient 14. Die Dokumentation begann ein Jahr vor der ersten Gabe von Adefovir und wurde bis fünf Monate nach der zweiten Sequenzierung fortgeführt. HBsAg-Bestimmung erfolgte bis einschließlich November 2004. Die beiden Zeitpunkte, zu denen die Klonierung und Sequenzierungen durchgeführt wurden, sowie der Beginn der ADF-Therapie sind durch schwarze Pfeile markiert. Zeit zw. 1. und 2. Sequenzierung: 24 Monate.

Nach zwei Jahren entsprachen alle HBV-Klonen Genotyp A (jeweils Serotyp adw2). Ein Wechsel des ursprünglichen Genotypes in einen anderen durch Mutationen an den entsprechenden Positionen des HBsAg ist zwar theoretisch möglich, aber unwahrscheinlich. Eine wahrscheinlichere Erklärung für diese Beobachtung wäre eine Ko-Infektion mit beiden Genotypen und spätere Selektion / Dominanz des Genotyp A - HBV. Ko-Infektionen mit mehr als einem Virus kommen vor, besonders bei den wenigen bisher beschriebenen Infektionen mit Genotyp G. Hier besteht in der Regel eine Ko-Existenz mit Genotyp A – HBV [110], wie wahrscheinlich auch bei diesem Patienten.

Vor Beginn der ADF-Therapie wurde Patient 14 mit Lamivudin behandelt. Unter Lamivudin kam es zu einem HBV-Titeranstieg von  $10^4$  auf  $10^6$  GE/ml, so dass die Therapie auf Adefovir umgestellt wurde. Innerhalb des ersten Jahres fiel der HBV-DNA-Titer darauf auf  $3 \times 10^4$  GE/ml; ein weiteres Jahr später war die Viruslast wieder leicht angestiegen und lag nun bei  $6 \times 10^4$  GE/ml. Auch im Verlauf der nächsten 5 Monate stieg der Titer weiter an und erreichte schließlich  $10^6$  GE/ml. Der HBsAg-Spiegel lag unter Lamivudin zwischen 200 und 280 mE/ml, und stieg ein Jahr nach Beginn der Adefovirtherapie auf 380 mE/ml an. Bei diesem Patienten konnte weder unter Lamivudin- noch unter Adefovirtherapie eine Absenkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze erzielt werden.

### Sequenzierung der Klone

Patient 14									
Vor ADF-Behandlungsbeginn (a)					Nach 24 Monaten (b)				
Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 21	Klon 1	Klon 2	Klon 23	Klon 24	Klon 25
			S 74 P						V 30 G
	L 77 S				I 53 S	I 53 S	I 53 S	I 53 S	I 53 S
L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M	L 180 M					L 179 P
M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V	M 204 V	A 181 T	A 181 T	A 181 T	A 181 T	A 181 T
L 229 V	L 229 V	L 229 V	L 229 V	L 229 V	N 238 S				
N 238 T	N 238 T	N 238 T	N 238 T	N 238 T			D 263 G		
		W 243				L 338 P			
		R							
			M 309 V						

Tab. 3.14 Übersicht der in den einzelnen HBV-Klonen (RT-Domäne) nachgewiesenen Mutationen bei Patient 14 – vor und nach Behandlung mit Adefovir. **Rosa:** Vor Therapiebeginn nachgewiesene Mutationen, die nach 24 Monaten Behandlung mit Adefovir bei keinem Klon mehr nachweisbar waren. **Blau:** Mutationen, die unter der Therapie mit Adefovir neu auftraten.

Sollte vor Beginn der ADF-Therapie schon Genotyp A - HBV vorhanden gewesen sein, dann handelte es sich wahrscheinlich nur um eine minore Population, da sich unter fünf (a)-Klonen kein einziger Klon mit Genotyp A fand. Da der Patient vor Beginn der Adefovirtherapie mit Lamivudin behandelt wurde bestand z.B. die Möglichkeit, dass Lamivudinresistenzmutationen als erstes bei den G-Genotypen auftraten und diesen



einen Selektionsvorteil vor den A-Genotypen sicherten, so dass zu Beginn der Adefovirbehandlung kein Genotyp A - HBV mehr nachweisbar war.

Die Behandlung mit Lamivudin ging der Adefovirtherapie unmittelbar voraus, erwartungsgemäß fand sich bei allen untersuchten HBV-Klonen vor der ersten Adefovirgabe die typische Konstellation aus Lamivudin-Resistenzmutation rtM204V und kompensatorischer Mutation rtL180M. Auch die Mutation rtL229V, die zu Beginn der Adefovirtherapie bei allen Klonen nachweisbar war, wurde in einigen Fällen im Zusammenhang mit Lamivudinresistenz diskutiert [111]. Zusätzlich ließ sich bei allen Klonen rtN238T nachweisen, eine Mutation, die aufgrund ihrer Position in der RT-Domäne auffiel (Nähe zur ADF-Resistenzmutation rtN236T), aber bislang nicht mit Resistenzvermittlung in Verbindung gebracht werden konnte (s.o.). Nach 24 Monaten ADF-Therapie fand sich noch bei einem Klon, 1 (b), eine Substitution an Position rt238, allerdings lag diesmal ein Asparagin-zu-Serin- statt Asparagin-zu-Threonin Austausch vor. Beide Aminosäuren besitzen ähnliche chemische Eigenschaften (ungeladene, polare Seitenketten, Hydroxylgruppe). Nach zwei Jahren ADF-Therapie wiesen alle HBV-Klone durchgängig die Mutation rtA181T auf, damit bestand eine Adefovir-resistente Viruspopulation.

## Phylogenie

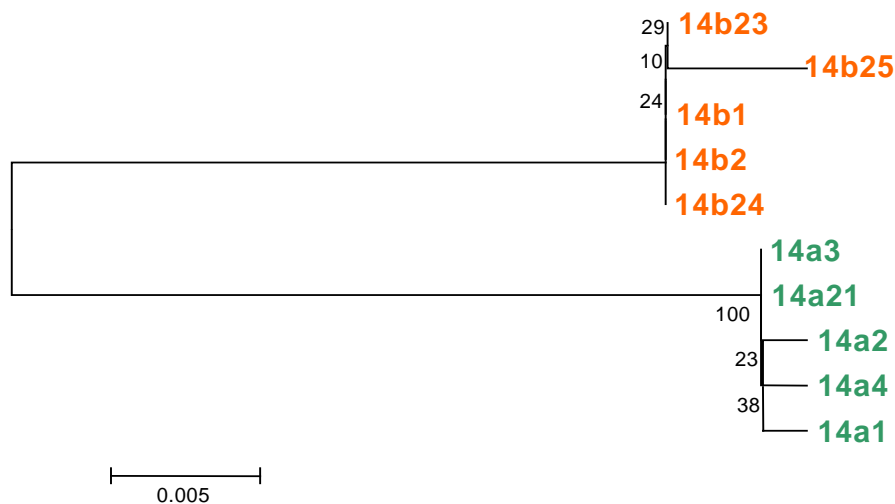


Abb. 3.32 Phylogenetische Auftrennung (*neighbour joining tree*) der Viruspopulationen von Patient 14. Die Zahlen an den Aufzweigungen geben die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Verteilung wieder. 14a: Klone von Patient 14 vor Therapiebeginn mit Adefovir; 14b: Klone von Patient 14 nach 24-monatiger ADF-Therapie

Wie bereits durch den Genotyp-Wechsel von G zu A deutlich wurde, lagen vor und nach ADF-Behandlung zwei klar abgrenzbare Populationen vor. Zwischen den (a) und (b) –

Klonen bestand keine phylogenetische Ähnlichkeit. Aus Tab. 3.14 wurde ersichtlich, dass keine Mutation, die vor Therapiebeginn in der viralen Population nachweisbar war, nach 24 Monaten Therapie mehr in einem der Klone detektiert werden konnte. Sowohl (a)- als auch (b)-Populationen waren jedoch in sich genetisch verhältnismäßig homogen. Die ADF-Therapie hatte bei diesem Patienten anscheinend zur Dominanz einer resistenten, zuvor noch nicht nachweisbaren HBV-Population geführt.

Wie bei Patient 13 bereits beschrieben, führt die ADF-Resistenzmutation rtA181T zu einem Stopp-Codon im Gen des HBsAg, so dass dieses um 300 Basenpaare verkürzt wird. Gegebenenfalls könnte eine bei diesem Patienten noch vorhandene HBV-Minorpopulation mit vollständigem S-Protein die Defizite eines funktionell beeinträchtigten, verkürzten HBsAg kompensieren.

## Phänotypisierung der Mutante rtI233V

Wie durch die Lamivudin-Resistenzmutation rtM204V / I bekannt, kann bereits eine einzige Mutation innerhalb einer konservierten Region der RT-Domäne die HBV-Polymerase unempfindlich gegen ein Nucleosidanalogen werden lassen. Auch bei Adefovir wurden solche Mutationen beschrieben, z.B. rtN236T (Angus et al., 2003 [81]). Die Kenntnis über Resistenzmutationen ist für die Therapieplanung der chronischen Hepatitis B von essentieller Bedeutung. Durch regelmäßige HBV-DNA-Titer-Bestimmungen und Sequenzierungen können die Patienten auf bereits vorhandene resistente Viruspopulationen untersucht werden. So kann rechtzeitig reagiert und die Behandlung auf ein anderes Nucleosidanalogen umgestellt werden, noch bevor ein Therapieversagen klinisch manifest wird.

Die Mutation rtI233V wurde mehrmals bei Patienten beobachtet, die nicht auf Adefovirtherapie ansprachen, z.B. bei den Patienten 2 und 3. Auch die HBV-Population eines weiteren Patienten, bei dem durch Adefovir kein Therapieerfolg erzielt werden konnte, wies diese Mutation auf. (Patient G, außerhalb des hier untersuchten Kollektivs, Serum wurde freundlicherweise von Prof. W. Gerlich aus dem Institut für Medizinische Virologie der Universität Gießen zur Verfügung gestellt). Dieser 52-jährige Patient G wurde zunächst mit Lamivudin behandelt. Als es nach drei Monaten zu einem Anstieg der Virämie kam, wurde die Therapie auf Tenofovir umgestellt. Unter Tenofovir konnte der HBV-DNA-Titer bei 740 GE/ml konstant gehalten werden. 6 Monate später erfolgte die Umstellung auf Adefovir. Unter Adefovir wurde ein sofortiger Anstieg der Virämie beobachtet, so dass die Tenofovirbehandlung sieben Monate später wieder aufgegriffen wurde. Darunter kam es erneut zum Abfall des viralen DNA-Titers.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum, unabhängig von den verschiedenen Therapien, blieb bei diesem Patienten die Mutation rtI233V in der RT-Domäne des HBV nachweisbar.

Aus dem Serum des Patienten wurden aus HBV-PCR-Amplifikaten sowohl eine Direktsequenzierung als auch eine Klonierung mit anschließender Sequenzierung der klonierten DNA durchgeführt. Das gesamte HBV-Genom wurde in acht überlappenden Fragmenten sequenziert und anhand der überlappenden Enden mithilfe der MacVector™ 7.0 Software zusammengefügt. Neben rtI233V waren in der RT-Domäne der HBV-Population dieses Patienten auch die Mutationen rtS21A, rtY54H, rtP130Q, rtD131N, rtE263D, rtI266R, rtI269L sowie rtI278V nachweisbar.

Um die Auswirkungen der Mutation rtI233V auf die HBV-Polymerase *in vitro* untersuchen zu können, wurde diese mittels gerichteter Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) in die HBV-Referenzsequenz (Plasmid pTHBV1.3, HBV-Wildtyp) eingefügt. Die mutierten HBV-

Genome wurden in C3A-Zellen (humane Hepatoblastom-Zelllinie) transfiziert und über sechs Tage mit Adefovir, Tenofovir und Lamivudin in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Intermediate der HBV-Replikation wurden mittels Southern Blot analysiert. Sezernierte Virus-DNA aus dem Zellüberstand wurde durch PCR nachgewiesen.

Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Anneke Funk durchgeführt.

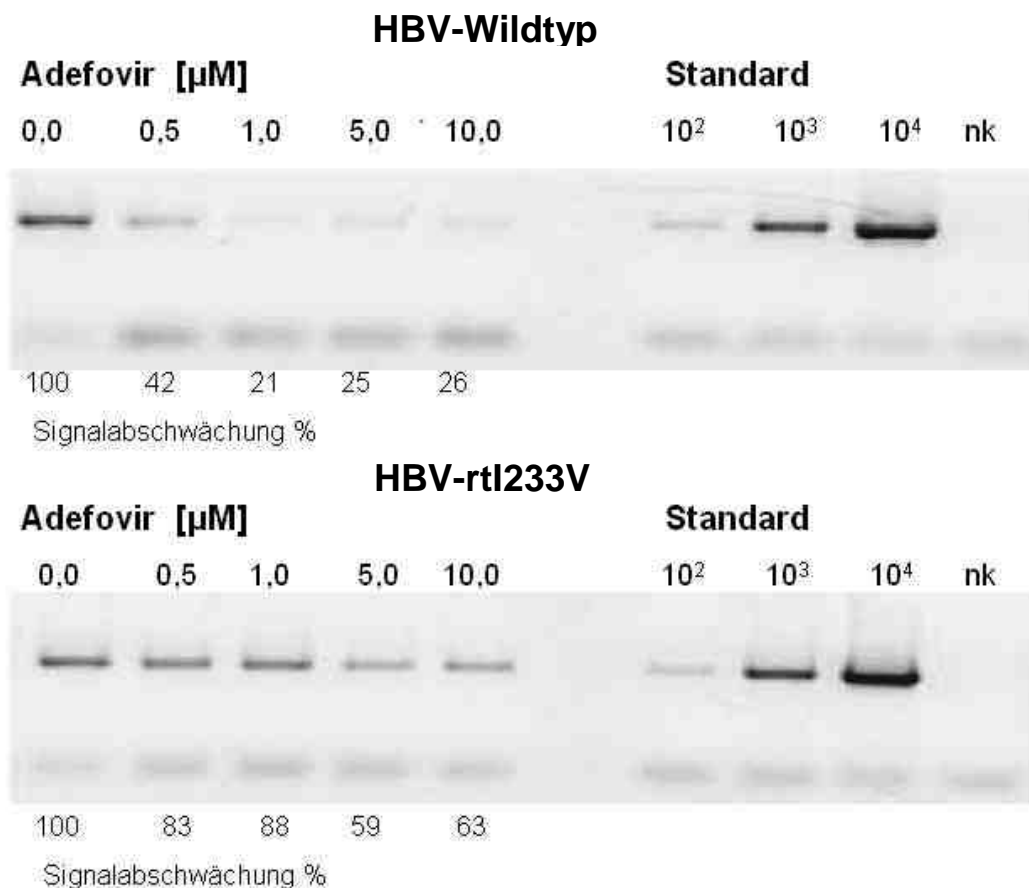


Abb. 3.33 PCR von HBV-DNA aus dem Überstand von transfizierten C3A-Zellen. Die Zellen wurden mit Wildtyp-HBV-DNA (Plasmid pTHBV1.3; oben im Bild) und mit der rtI233V-HBV-Mutante (unten im Bild) transfiziert. Die Behandlung erfolgte mit aufsteigenden Konzentrationen von Adefovir. Als Mengenstandard dienen Verdünnungen von Wildtyp-HBV-DNA von 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> und 10<sup>4</sup> Genomäquivalenten. Nk: Negativkontrolle

Die Sekretion von HBV-DNA der mit der rtI233V-HBV-Mutante transfizierten Zellen ging bei einer Konzentration von 0,5 µM Adefovir um ca. 20 % zurück. Bei mit Wildtyp-HBV transfizierten Zellen konnte bei gleicher ADF-Konzentration ein Rückgang der Sekretion um ca. 60 % beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 1 µM Adefovir wurde die Sekretion der Virus-DNA der Mutante lediglich um ca. 10 % reduziert. Die gleiche ADF-

Konzentration führt bei Wildtyp-HBV zu einer Abnahme der Sekretion um fast 80 %. Auch bei 10-fach höherer Konzentration an Adefovir konnte keine dem HBV-Wildtyp entsprechende Reduktion an sezernierten Viruspartikeln erzielt werden. So kam es unter 10  $\mu\text{M}$  Adefovir im Zellmedium bei Wildtyp-HBV zu einer Minderung der Virus-DNA-Sekretion um über 70 %, bei rtI233V-HBV wurde lediglich ca. 40 % weniger DNA sezerniert.

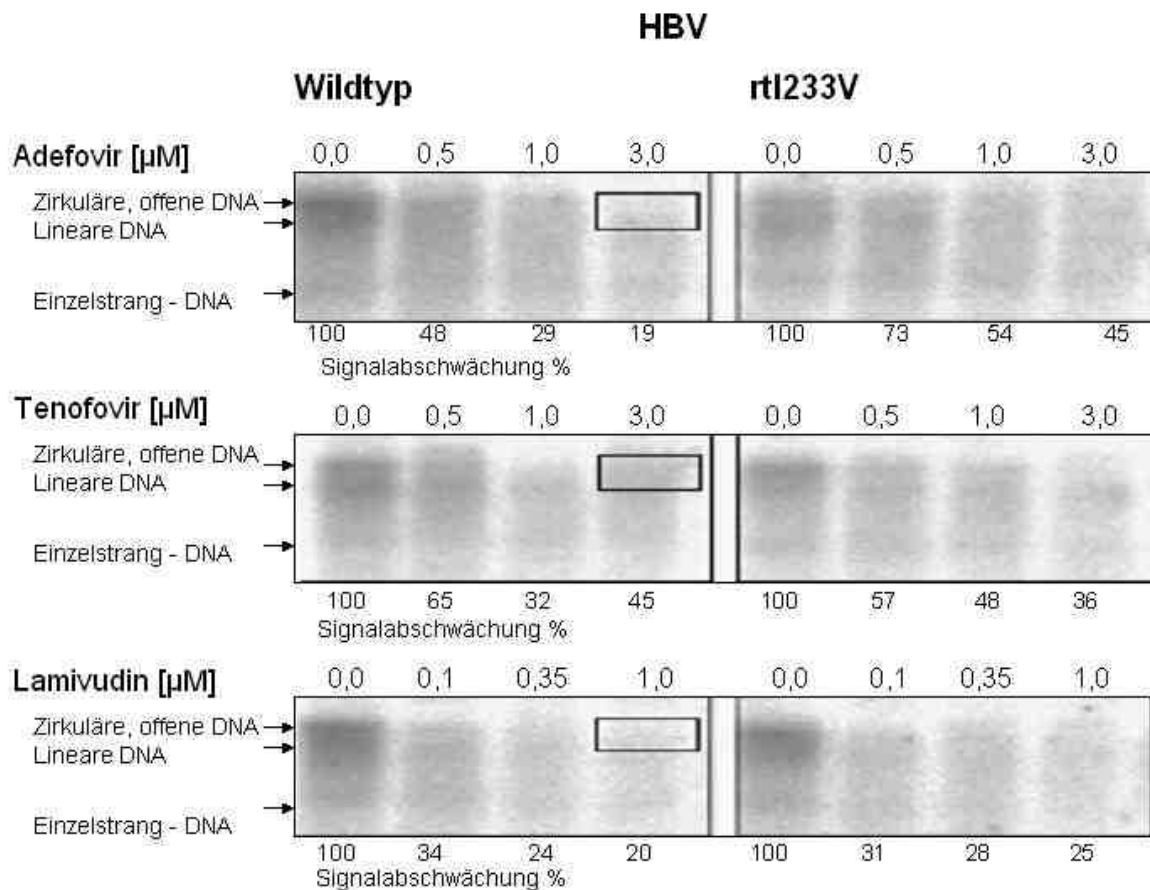


Abb. 3.34 Southern Blots der replikativen Intermediate aus den mit HBV-Wildtyp (re. im Bild) und mit rtI233V-HBV-Mutante transfizierten Zellen. Die Behandlung erfolgte mit den Nukleotidanaloga Adefovir (oben) und Tenofovir (mitte) sowie mit dem Nukleosidanalogen Lamivudin (unten). Der schwarze Kasten markiert die für die Quantifizierung genutzte Fläche. Bei der unbehandelten Probe wurde die Intensität dieser Fläche als 100% definiert und mit den anderen Banden korreliert.

Die rtI233V-HBV-Mutante schien also deutlich unempfindlicher als Wildtyp-HBV gegenüber Adefovir zu sein, die Sekretion der viralen Partikel wurde auch durch vergleichsweise hohe ADF-Konzentrationen nur wenig beeinträchtigt.

Eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Adefovir im Zellmedium führte bei mit Wildtyp-HBV transfizierten Zellen zu einer Reduktion der intrazellulären replikativen Intermediate um 50 %. Bei gleicher ADF-Konzentration konnte in Zellen mit transfizierter rtI233V-HBV-

Mutante nur 30 % weniger HBV-DNA nachgewiesen werden. Eine Reduktion der intrazellulären HBV-DNA um 50 % wurde hier erst bei ADF-Konzentrationen von 1 µM beobachtet, also der doppelten Dosis im Vergleich zu Wildtyp-HBV. Auch hier wurde also deutlich, dass HBV mit der Mutation rti233V eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Adefovir aufwies.

Wurden die Zellen mit Tenofovir oder Lamivudin behandelt, war dieser Effekt nicht zu beobachten. Bei den gleichen Konzentrationen im Zellmedium wurde hier bei Wildtyp-HBV- und rti233V-HBV-transfizierten Zellen die Anzahl der intrazellulären replikativen Intermediate ähnlich reduziert. Gegenüber diesen Nukleosidanaloga schien die Mutation rti233V dem Virus keinen nennenswerten Replikationsvorteil zu bieten.

Die Mutation rti233V konnte also bei den Patienten, bei denen sie vorkam, mangelndes Ansprechen auf ADF-Therapie und persistierend hohe HBV-DNA-Titer erklären.

### Mutationen innerhalb des HBsAg

Das Genom des Hepatitis B-Virus ist in 4 überlappende Leserahmen (*ORF, open reading frame*) aufgeteilt. Dabei überlagern sich die *ORFs* der viralen Polymerase und der Oberflächenproteine. Mutationen innerhalb der RT-Domäne der Polymerase können dementsprechend auch zu einer Sequenzveränderung des HBs-*ORFs* führen. In bestimmten Fällen entstand durch eine Mutation in der RT-Domäne ein Stopp-Codon im HBs-*ORF* und so ein vorzeitiges terminiertes HBs-Protein. Natürlich vorkommende HBV-Varianten mit unvollständigem HBsAg sind beschrieben, ebenso ist der Zusammenhang mit HBsAg-Seronegativität bekannt [112, 113].

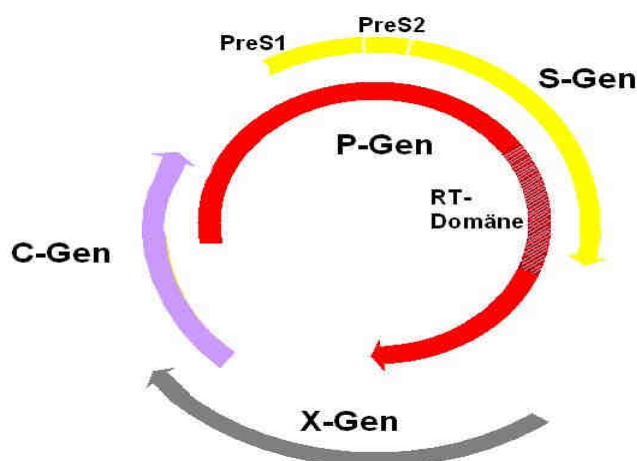


Abb. 3.35 Anordnung und Überlappung der *Open Reading Frames (ORFs)* des HBV Genomes. P-Gen: Gen der Polymerase, S-Gen inkl. PreS1 und PreS2: Gene der Oberflächenproteine L, M und S. C-Gen: Gene des Core-Proteins. X-Gen: Gen des X-Proteins

Bei allen hier beschriebenen Patienten konnte über einen längeren Untersuchungszeitraum hinweg HBsAg im Serum nachgewiesen werden, dennoch fanden sich in mehreren Fällen Deletionen innerhalb der HBs-Sequenz. In der Regel konnte man von einer Koexistenz HBsAg-unbeeinträchtigter Viren und solcher mit verkürztem HBsAg ausgehen, unter der die Infektiosität der Viren mit fehlerhaften HBsAg gewährleistet blieb. Bruss et. al. [114] konnten nachweisen, dass sich bei Ko-Existenz von Wildtyp- und mutiertem HBsAg gemischte Proteine bildeten, durch die Defizite der verkürzten Form ausgeglichen werden können.

Auffällig war unter diesen Gesichtspunkten, dass bei einigen Patienten alle untersuchten Klone zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung ein verkürztes HBsAg aufwiesen. Es wäre also möglich, dass die Funktionalität des Proteins und damit auch die Replikation des Virus trotz der Deletionen weiterhin gewährleistet blieb.

Die Mutation rtA181T, eine im Zusammenhang mit Adefovirresistenz nicht selten beobachtete Variante (s.o.), führte zu einem Stopp-Codon im HBsAg, so dass es an Position (AS) 172 zu einem Kettenabbruch kam. Die besonders immunogene a-Determinante wurde dabei nicht beeinträchtigt. Obwohl das HBsAg C-terminal um 54 Aminosäuren verkürzt wurde, schien es als Majorpopulation im viralen Genpool der Patienten 13 und 14 vorzukommen. Bruss et al [114]. zeigten, dass HBsAg mit einer auf 178 Aminosäuren verkürzten Kette eine verringerte intrazelluläre Halbwertszeit aufwies und nicht mehr sezerniert wurde. Lag gleichzeitig Wildtyp-HBsAg in der Zelle vor, wurde die deletierte Form nicht nur stabilisiert, sondern auch wieder sekretiert, und zwar doppelt so effektiv wie Wildtyp-HBsAg alleine.

Im Falle der Patienten mit der Mutation rtA181T wurde HBsAg auch weiterhin effektiv sezerniert, wie aus den Werten der HBsAg-Bestimmung im Serum geschlossen werden konnte. Eventuell war also eine kleine Minorpopulation mit intaktem HBsAg vorhanden und konnte nur nicht nachgewiesen werden.

In der HBV-DNA von 4 Patienten (insg. 10 Klone) führten Nukleotidaustausche zu Stopp-Codons innerhalb des HBsAg, jedoch zu keinem Aminosäure-Austausch in der RT-Domäne der Polymerase. Auch diesen 10 Klonen müssten C-terminal verkürztes HBs exprimiert werden.

Klon	Position Stopp-Codon HBsAg	Korresp. Mutation RT-Domäne	Fehlende AS HBsAg
1b13	76	S 85 T	150
2a1	216	keine	10
2a11	199	V 208 I	27
2a4	216	keine	10
4b5	172	A 181 T	54
5a11	216	keine	10
5a42	216	keine	10
5b1	216	keine	10
5b2	216	keine	10
5b5	216	keine	10
6a1	136	keine	90
	172	A 181 T	54
6b2	172	A 181 T	54

Klon	Position Stopp-Codon HBsAg	Korresp. Mutation RT-Domäne	Fehlende AS HBsAg
13a1	216	keine	10
13a35	216	keine	10
13b2	172	A 181 T	54
13b1	172	A 181 T	54
13b21	172	A 181 T	54
13b4	172	A 181 T	54
13b22	172	A 181 T	54
14b1	172	A 181 T	54
14b2	172	A 181 T	54
14b23	172	A 181 T	54
14b24	172	A 181 T	54
14b25	172	A 181 T	54

Tab. 3.15 Übersicht der Klone mit Deletionen innerhalb des HBsAg. Angegeben ist die Position des Stopp-Codons, die Anzahl der Aminosäuren (AS), um die das HBsAg verkürzt ist und, sofern vorhanden, die korrelierende Mutation innerhalb der überlappenden RT-Domäne

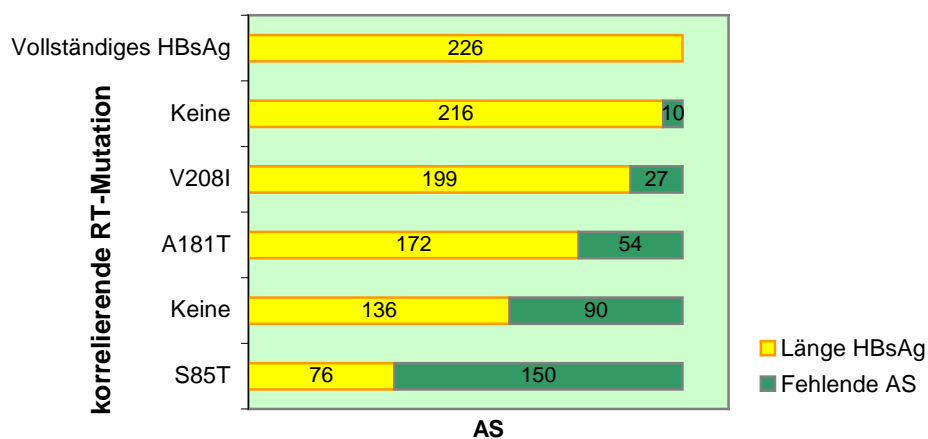


Abb. 3.36 Verkürzung des HBsAg durch Stopp-Codons im ORF des S-Proteins. Die korrelierende Mutation der überlappenden RT-Domäne ist jeweils links dargestellt. AS: Aminosäure/n



Im Zellkultursystem wurden die Auswirkung der häufigen Adefovir-Resistenzmutation rtA181T auf die Synthese des HBs-Proteins untersucht. Dazu wurden C3A-Zellen mit insgesamt drei HBV-Konstrukten transfiziert. In den Vektor pTHBV1.3 (HBV-Wildtypsequenz, Genotyp D) wurden jeweils die Mutationen rtA181T und rtN236T eingebracht. Bei rtN236T handelt es sich um eine Mutation, die zwar Resistenz gegenüber Adefovir vermittelt, jedoch keine Substitutionen im ORF des HBs-Proteins bewirkt. Da rtN236T und rtA181T häufig kombiniert auftreten, wurde zusätzlich eine HBV-Variante mit beiden Mutationen transfiziert. Als Kontrolle diente die unveränderte HBV-Wildtypsequenz.

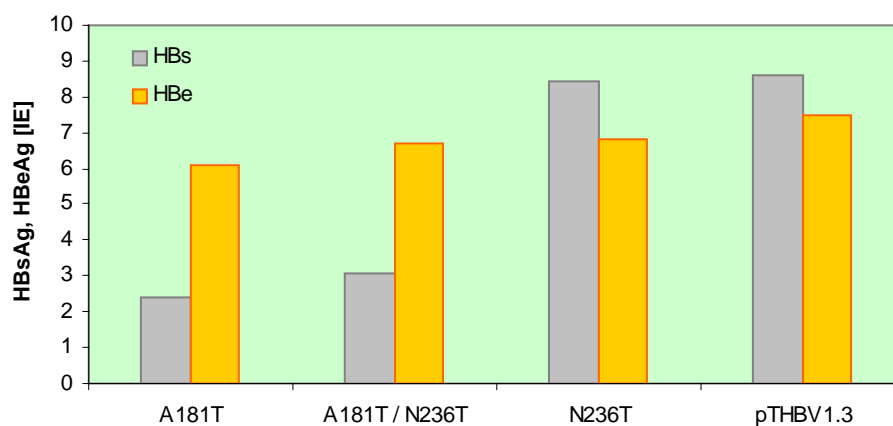


Abb. 3.37 HBs und HBe-Protein aus dem Überstand transfizierter C3A-Zellen: Transfektion mit den HBV-Mutanten A181T, N236T, A181T+N236T sowie mit HBV-Wildtyp (pTHBV1.3). Arithmetische Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus den Überständen der mit rtA181T transfizierten Zellen war deutlich weniger HBsAg nachweisbar als bei rtN236T-HBV oder pTHBV1.3. Auch die Kombination aus rtA181T und rtN236T führt zu einer reduzierten HBsAg-Sekretion. Im Gegensatz zu Wildtyp-HBV, aber auch zu der HBV-Mutante rtN236T war das HBsAg im Zellmedium um ca. ein Drittel vermindert. Die Sekretion von HBeAg war bei allen HBV-Konstrukten vergleichbar, so dass die unterschiedlichen HBs-Konzentrationen nicht auf ungleiche Transfektionseffizienzen zurückzuführen waren.

Die Mutation rtA181T führt also zu einem Defizit in der HBsAg-Synthese oder Sekretion *in vitro*.

## Verteilung der Mutationen innerhalb der RT-Domäne

Die RT-Domäne der HBV Polymerase setzt sich aus 6 konservierten Regionen (A – F) und dazwischen liegenden, variableren Sequenzabschnitten zusammen [115]. Alle bisher bekannten Resistenzmutationen liegen in diesen konservierten Regionen. Die bekannten, häufigen Lamivudin-Resistenzmutationen lassen sich den Regionen B und C zuordnen, während Adefovir-Resistenzmutationen eher in Region D zu finden sind.

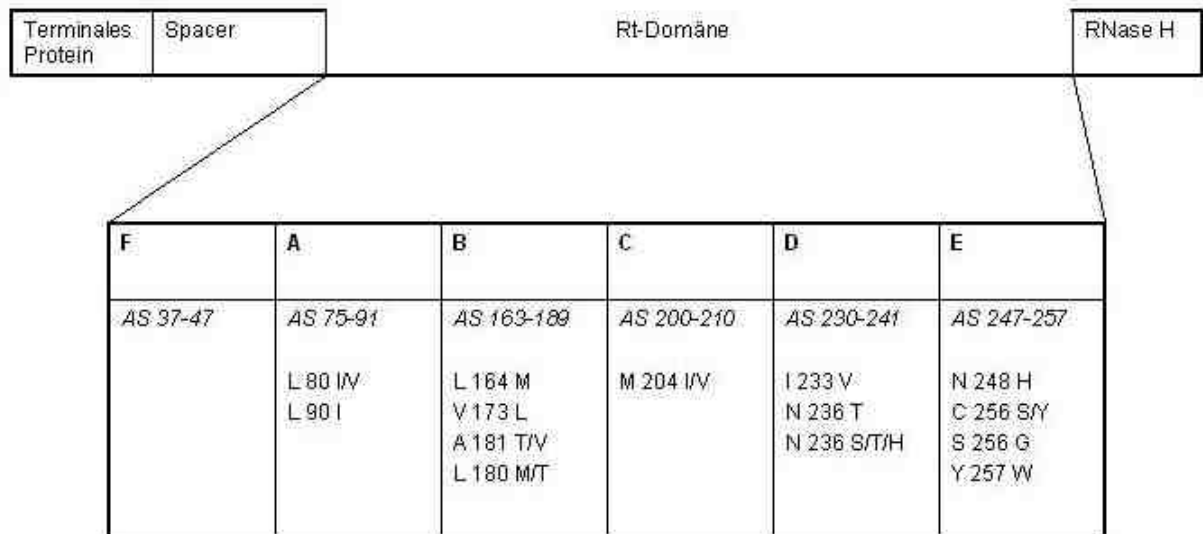


Abb. 3.38 Verteilung der innerhalb konservierter Regionen der RT-Domäne nachgewiesenen Mutationen. Aufgelistet sind Mutationen, die zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung nachweisbar waren. AS: Aminosäuren

Die Einteilung der RT-Domäne in konservierte und weniger konservierte Regionen erlaubt eine Gewichtung der einzelnen Mutationen. Zusammengenommen wurden – bei insgesamt 14 Patienten, nach mehreren Monaten unter Adefovirtherapie ((b)-Klone) – die RT-Domänen von 70 Klonen untersucht, dabei wurden an insgesamt 434 Stellen Abweichungen von der jeweiligen Referenz-Genotypsequenz nachgewiesen<sup>1</sup>. Nur ca. ein Viertel aller gefundenen Mutationen lag innerhalb von konservierten Regionen (108 von 434). Die Hälfte dieser Mutationen (51 von 108) war bereits zu Beginn der Adefovirtherapie in der viralen Population vorhanden (z.B. persistierende Lamivudin-Resistenzmutationen). Insgesamt konnten demnach etwas mehr als ein Drittel der während der Therapie erstmals nachgewiesenen Mutationen einer konservierten Region zugeordnet werden.

<sup>1</sup> In die Auswertung gingen nur Mutationen mit ein, die bei mindestens zwei Klonen nachgewiesen werden konnten.

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
A 21 S	4	8,6 %
S 21 A	1	
S 21 C	1	
I 53 S	6	17,1 %
N 53 D	4	
I 53 V	2	
Y 54 H	11	15,7 %
L 80 V/I	5	7,1 %
L 115 V	5	7,1 %
P 130 Q/S	5	7,1 %
M 146 L	5	7,1 %

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
A 181 T	12	24,3 %
A 181 V	5	
M 204 I	5	7,1 %
I 233 V	9	12,9 %
N 236 T	6	8,6 %
E 263 D	4	7,1 %
D 263 G	1	
I 266 R	5	7,1 %
I 278 V	9	12,9 %

Tab. 3.16 Absolutes und relatives Auftreten aller Mutationen, die zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung (17-31 Monate nach Beginn der ADF-Therapie) innerhalb der HBV-Populationen von Patienten erstmalig nachgewiesen wurden. Mutationen, die bei mehr als 15 % der insgesamt 70 (b)-Klone vorkamen, sind rot markiert. Mutationen, die bei weniger als 5 Klonen auftraten, sind nicht aufgeführt.

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
S 21 A	25	42,9 %
A 21 S	4	
S 21 C	1	
I 53 S	6	22,9 %
N 53 D	4	
N 53 I	5	
I 53 V	1	
Y 54 H	11	22,9 %
Y 54 S	5	
L 80 I/V	5	7,1 %
L 91 I	6	8,6 %
L 115 V	5	7,1 %
L 122 F	22	40,0 %
L 122 I	5	
L 122 V	1	
N 124 H	19	34,3 %
N 124 Y	5	
H 126 Y	5	7,1 %
M 129 L	5	7,1 %
P 130 Q	23	34,3 %
P 130 S	1	
D 131 N	28	40,0 %
Y 135 S	19	32,9 %
S 135 F	4	
L 145 M	5	7,1 %
M 146 L	5	7,1 %
Y 148 F	5	7,1 %
Q 149 K	5	7,1 %
L 164 M	5	7,1 %

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
V 173 L	8	11,4 %
L 180 M	5	8,6 %
L 180 T	1	
A 181 T	13	25,7 %
A 181 V	5	
M 204 I	9	17,1 %
M 204 V	3	
F 221 Y	5	8,6 %
F 221 C	1	
A 223 S	5	7,1 %
I 233 V	9	12,9 %
N 236 T	10	14,3 %
N 248 H	14	20,0 %
C 256 Y	5	12,9 %
C 256 S	4	
Y 257 W	5	7,1 %
E 263 D	23	34,3 %
D 263 G	1	
I 266 R	10	14,3 %
Q 267 H	4	12,9 %
Q 267 M	4	
Q 267 I	1	
E 271 D	8	12,9 %
H 271 Q	1	
I 278 V	28	40,0 %
A 329 T	5	7,1 %

Tab. 3.17 Absolutes und relatives Auftreten aller Mutationen, die 17 bis 31 Monate nach Beginn der ADF-Therapie in den RT-Domänen von insgesamt 70 (b)-Klonen nachgewiesen wurden. Mutationen, die bei weniger als 5 Klonen auftraten, sind nicht aufgeführt. Mutationen, die bei über 30 % aller Klone nachgewiesen wurden, sind rot markiert.

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
S 21 A A 21 S S 21 C	48 4 1	39,5 %
A 38 E	6	4,5 %
M 45 L	5	3,7 %
N 53 I I 53 S I/N 53 V/D/S	10 9 6	18,7 %
Y 54 H Y 54 S	13 10	9,7 % 7,5 %
L 80 I/V	6	4,5 %
L 91 I	9	6,7 %
L 115 V	5	3,7 %
L 122 F L 122 I L 122 V	37 12 1	37,3 %
N 123 D/S	6	4,5 %
N 124 H N 124 Y	34 10	32,8 %
H 126 Y Y 126 H	11 1	9,0 %
M 129 L	10	7,5 %
P 130 Q P 130 S	41 1	31,3 %
D 131 N	53	40,0 %
Y 135 S S 135 F/Y	42 8	37,3 %
V 142 I V 142 A/G/T	7 3	7,5 %
L 145 M	10	7,5 %
M 146 L	5	3,7 %
Y 148 F	10	7,5 %
Q 149 K Q 149 P	11 1	9,0 %
L 164 M	10	7,5 %
V 173 L	18	13,4 %

Mutation RT-Domäne	Anzahl der Klone	Relative Häufigkeit
L 180 M L 180 T	31 1	23,9 %
A 181 T A 181 V	13 5	13,4 %
M 204 V M 204 I	24 17	30,6 %
S 219 A	9	6,7 %
F 221 Y F 221 C	10 1	8,2 %
A 223 S	10	7,5 %
V 224 I	5	3,7 %
L 229 V	8	6,0 %
I 233 V I 233 T	9 1	7,5 %
N 236 T	11	8,2 %
N 238 T N 238 H/S	5 2	5,2 %
N 248 H	32	23,9 %
C 256 S C 256 Y C/S 256 G	19 10 3	23,9 %
Y 257 W W/Y 257 R/C	10 2	9,0 %
E 263 D D 263 G/N	41 2	32,1 %
I 266 R I 266 K/M	15 6	15,7 %
Q 267 M Q 267 H Q 267 I	9 7 1	12,7 %
E 271 D H 271 Q	13 6	14,2 %
I 274 V	5	3,7 %
I 278 V V 278 A	46 1	35,1 %
M 309 I/K/V	5	3,7 %
A 329 T	10	7,5 %

Tab. 3.18 Absolutes und relatives Auftreten aller Mutationen in den RT-Domänen von insgesamt 134 analysierten HBV-Klonen ((a) und (b)). Mutationen, die bei weniger als 5 Klonen auftraten sind nicht aufgeführt. Mutationen, die bei über 30 % aller Klone nachgewiesen wurden, sind rot markiert.

Bis auf Region F ließen sich in allen konservierten Bereichen der RT-Domäne Veränderungen des Virusgenoms nachweisen. Mutationen in konservierten Bereichen sollten sich in der Regel stärker auf die Funktionalität der Reversen Transkriptase auswirken als Mutationen in variablen Regionen des Enzyms. Neu aufgetretene Mutationen in konservierten Regionen mussten unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen Resistenzvermittlung deshalb genauer betrachtet werden.

Zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung (b) fanden sich neu aufgetretene Mutationen vor allem in den Bereichen A, B und D. Innerhalb von Bereich A waren die Mutationen rtL80I/V und rtL91I lokalisiert. Erstere soll im Zusammenhang mit Lamivudinresistenz die – durch das veränderte YMDD-Motiv (rtM204I/V) – verminderte Replikationseffizienz des Virus wiederherstellen [116]. Allerdings ließ sich rtL80I/V nur bei einem einzigen Klon (Patient 9, Klon 2 (a)) unmittelbar nach Lamivudintherapie nachweisen. Dieser Klon wies keine bekannten Lamivudin-Resistenzmutationen auf. In den anderen Fällen trat rtL80I/V erst nach monatelanger Behandlung mit Adefovir hervor, jedoch immer zusammen mit einem noch persistierenden YIDD-Motiv. Auch rtL91I trat gemeinsam mit der Resistenzmutation rtM204I auf. Die Bedeutung der Mutation rtL91I ist jedoch noch nicht bekannt.

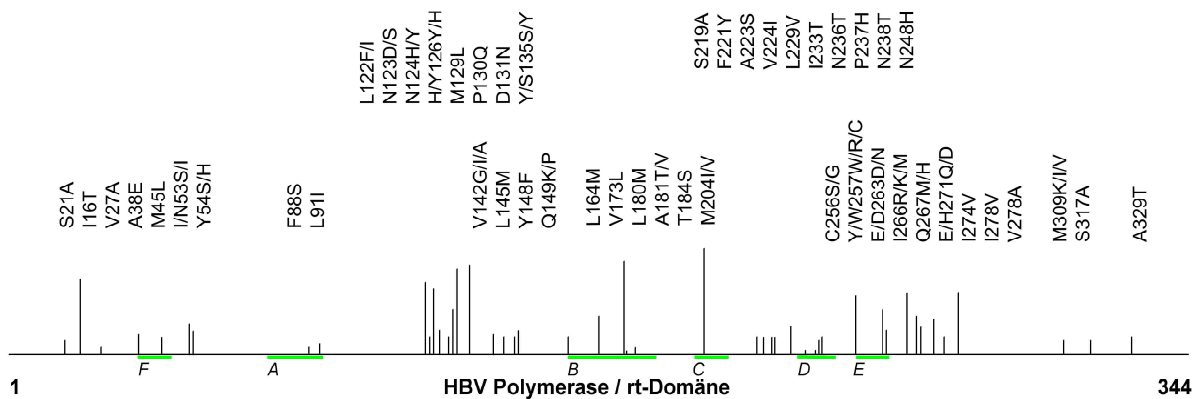


Abb. 3.39 Lokalisation der Mutationen innerhalb der RT-Domäne zu Beginn der Adefovirtherapie (Zeitpunkt 0), aus allen Patienten zusammengefasst. Die Länge der vertikalen Linie entspricht der absoluten Häufigkeit des Auftretens. Grün: konservierte Regionen innerhalb der RT-Domäne

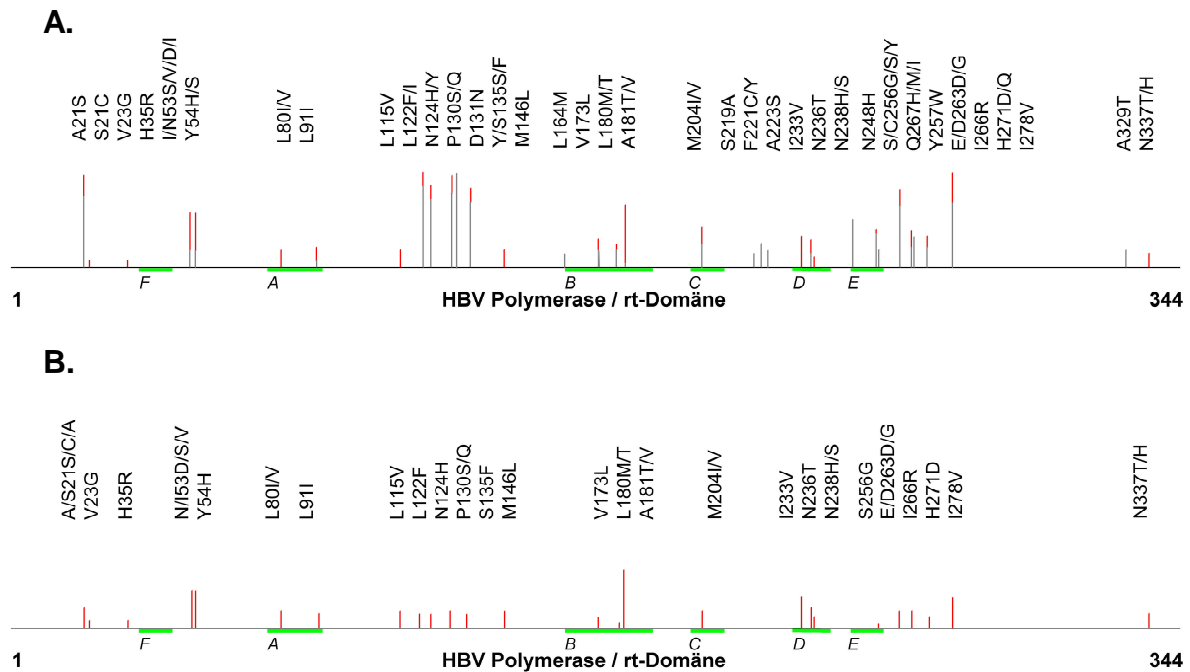


Abb. 3.40 Lokalisation der Mutationen innerhalb der RT-Domäne, aus allen Patienten zusammengefasst. A) Alle zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung nachgewiesenen Mutationen, die Länge der vertikalen Linie entspricht der absoluten Häufigkeit des Auftretens. Rot: Anteil der Mutationen, die unter ADF-Therapie erstmalig auftraten. B) Unter ADF-Therapie aufgetretene Mutationen, die vor Therapiebeginn noch nicht vorhanden waren. Grün: konservierte Regionen innerhalb der RT-Domäne.

In Region B, unmittelbar neben der Lamivudin-Resistenzmutation rtL180M, war die Mutation rtA181T/V lokalisiert, die mit Adefovirresistenz in Zusammenhang gebracht wird. Für diesen Zusammenhang sprach hier einerseits die Häufigkeit dieser Variante – unter allen während der Adefovirtherapie neu aufgetretenen Mutationen nahm rtA181T mit Abstand den ersten Platz ein – andererseits auch der Bereich der RT-Domäne, in dem sie lokalisiert war, nämlich innerhalb einer konservierten Region, in der bereits resistenzvermittelnde Mutationen bekannt sind.

In Region D fielen bei mehreren HBV-Klonen Veränderungen an Position 238 auf (rtN238H/S/T); in unmittelbarer Nachbarschaft befanden sich die Adefovir-Resistenzmutationen rtN236T und rtI233V. Substitutionen an Position 238 wurden noch nicht auf phänotypische Eigenschaften untersucht und eine Resistenzvermittlung ist nicht bekannt. Dennoch rechtfertigte allein die Position dieser Mutation einige Überlegungen bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Integrität der viralen Polymerase und auf eine eventuell veränderte Wirksamkeit von Nukleosidanaloga.

Region E schien im Hinblick auf Adefovirresistenz, ebenso wie die Regionen F und C, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es traten keine neuen Mutationen in diesen Bereichen der RT-Domäne auf.

Die typischen Lamivudin-Resistenzmutationen traten kaum bei Lamivudin-naiven Patienten auf. Im Gegensatz dazu schienen die meisten Mutationen, die bei Adefovir-resistenten HBV nachweisbar waren, auch bei Adefovir-naiven Patienten vorzukommen. Die meisten der nach Adefovirtherapie neu aufgetretenen Mutationen waren in geringerem Umfang auch bei Patienten ohne vorhergehende Adefovir-Exposition nachweisbar.

Betrachtete man das Neuauftreten und Verschwinden von Mutationen innerhalb der (fiktiven) viralen Gesamtpopulation, so fielen außerhalb der konservierten Regionen einige Bereiche der RT-Domäne durch besondere Variabilität auf. Dazu gehörten z.B. die Positionen rt21 und rt53 / 54, die Bereiche rt122 - rt135 sowie rt263 - rt278. Hier kam es gehäuft zum Auftreten von Mutationen, was an dieser Stelle den Begriff Polymorphismen gerechtfertigt erscheinen ließ [115].

Durch besondere Variabilität fiel die Region rt122 - rt135 auf. Bei Patient 9 (Klon 10 (b)) fand sich nach 24-monatiger Behandlung mit Adefovir eine virale Subpopulation, die an dieser Position eine drei-Nukleotid-Deletion aufwies. Dies resultierte in einer um eine Aminosäure verkürzten RT-Domäne und in einem ebenso verkürzten HBsAg. Bei Patient G (s. Kapitel: Phänotypisierung der Mutation rt1233V) konnte an gleicher Stelle eine HBV-Majorpopulation mit einer Insertion von drei Codons nachgewiesen werden, dadurch wurden sowohl RT-Domäne als auch HBsAg um drei Aminosäuren verlängert.

Nach der einheitlichen Nomenklatur ist die RT-Domäne von humanpathogenem HBV immer 344 Aminosäuren lang (nur beim HBV des Wollaffes und bei Nagetier-HBV variiert die Länge dieses Proteins). Wie sich eine Deletion von drei Aminosäuren in der insgesamt relativ konservierten RT-Domäne der HBV-Polymerase auf Replikationsfähigkeit und –effizienz auswirkt, muss noch untersucht werden.



Sequenz der RT-Domäne		Sequenz des HBsAg	
<b>1)</b>	115	<b>2)</b>	101
Ref D	LSSNSRILN---NQHGTM <del>PD</del> LHD	Ref D	QGMLPVCPLIPGSS---TTSTGPCRT
Pat.G	LSSNSRIFN <b>HQY</b> DQYGTMQNLHD	Pat.G	RGMLPVCPLIPGSSTTSTTSTGPCRT
	*****.*.....*.***..***		.*****.....*..*****
<b>3)</b>	115	<b>4)</b>	101
Ref A	LSSNSRINNNQYGTMQNLHDSCS	Ref A	QGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTT
9b10	LSSNSRINN- <del>Q</del> YGTMQNLHDSCS	9b10	QGMLPVCPLIPG- <del>ST</del> TSTGPCKTCTT
	*****.*.....*****		*****.*.....*****

Tab. 3.19 Insertion und Deletion innerhalb HBsAg und RT-Domäne der Patienten G und 9 (Klon b10)

- 1) Vergleich der Sequenz von Patient G mit Genotyp D-Referenzsequenz: RT-Domäne. Deutlich wird die Insertion von 3 Aminosäuren an Position 124.
- 2) Vergleich der Sequenz von Patient G mit Genotyp D-Referenzsequenz: HBsAg. Die Insertion der drei Aminosäuren betrifft ebenso das überlappende HBsAg.
- 3) Vergleich der Sequenz von Patient 9, Klon b10 mit Genotyp A-Referenzsequenz: RT-Domäne. Es liegt eine Deletion an Position 124 vor.
- 4) Vergleich der Sequenz von Patient 9, Klon b10 mit Genotyp A-Referenzsequenz: HBsAg. An entsprechender Stelle findet sich auch innerhalb des HBsAg eine Deletion.

## Die genetische Divergenz der Viruspopulationen

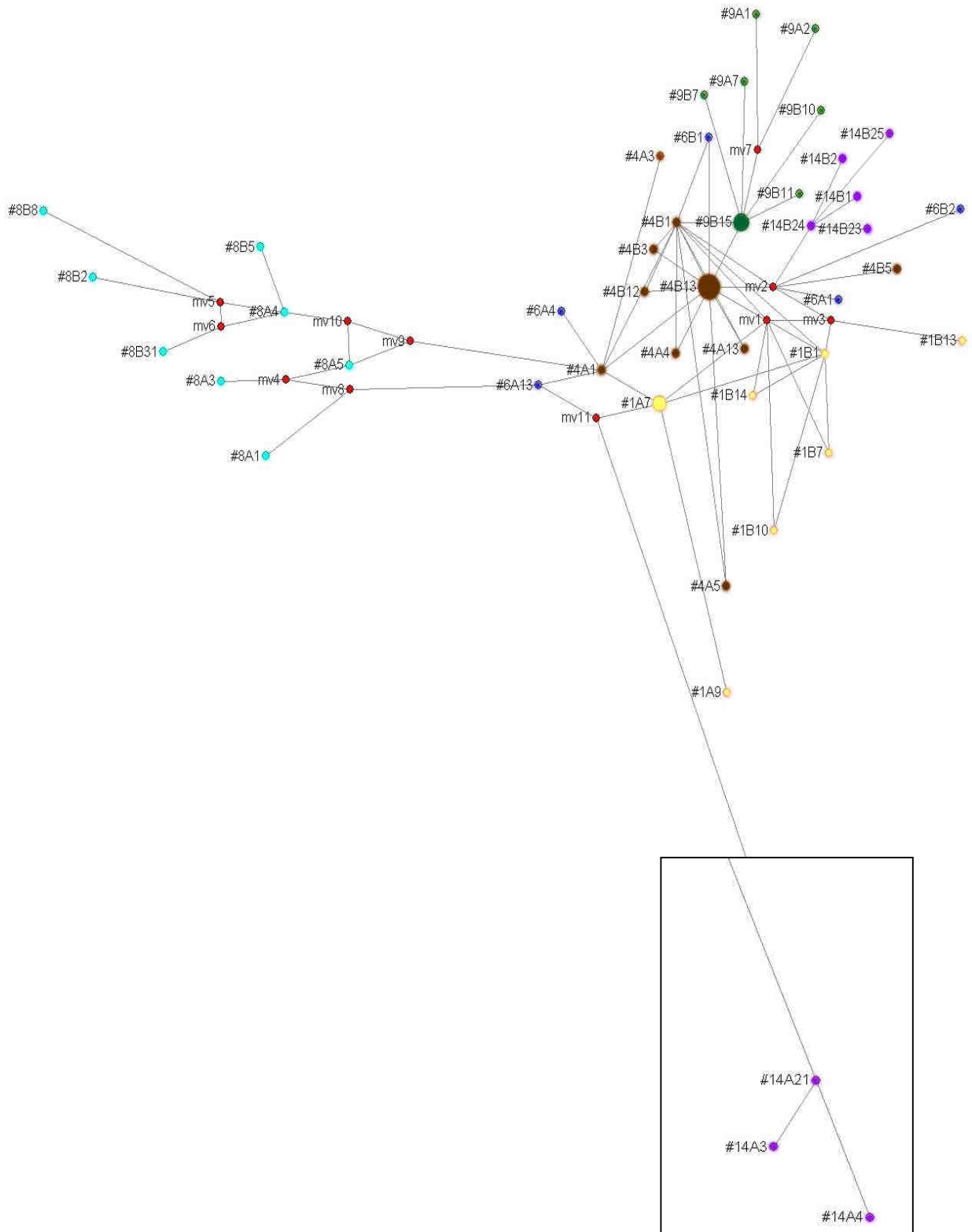


Abb 3.41 Phylogenetisches Netzwerk aller Klone mit HBV-Genotyp A. Die Sequenzen aus einem Patienten sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Die roten Punkte (mv) stehen für virtuelle HBV-Varianten, die wahrscheinlich einmal vorhanden waren, jedoch nicht nachgewiesen wurden.

Durch ein phylogenetisches Netzwerk, in dem die verschiedenen HBV-Klone aller Patienten dargestellt wurden, konnte die Entwicklung der einzelnen HBV-Populationen rekonstruiert werden. Die einzelnen Sequenzen der Klone sind durch Kreise markiert. Je bedeutender eine Sequenz für die Entwicklung weiterer Subpopulationen ist, desto größer ist der Durchmesser des Kreises. Anhand eines mathematischen Algorithmus wurde jedem möglichen Nukleotidaustausch ein bestimmter Rang zugewiesen. So konnte errechnet werden, ob sich eine Substitution direkt oder über einen Zwischenschritt ereignet hatte. Diese Zwischenschritte sind als virtuelle Vorfahren rot in das Netzwerk eingezeichnet. Die Netzwerke wurden getrennt für Genotyp A und D berechnet.

Die einzelnen Klone ordneten sich im Netzwerk auf unterschiedliche Art und Weise an. Bei Patient 14 (Abb. 3.41) dominierte vor Beginn der ADF-Therapie Genotyp G, später lag Genotyp A vor. Zur phylogenetischen Analyse wurde die (a)-Population in die Genotyp A – Gruppe eingeordnet, obwohl Genotyp G vorlag. Dementsprechend nahmen die (a)-Klone dieses Patienten eine sehr isolierte Position innerhalb des Netzwerks ein. Es bestand keine phylogenetische Ähnlichkeit zu der (b)-Population, wie die große Distanz innerhalb des Netzwerkes belegt. Ein ähnliches Bild bot sich bei der Darstellung der Viruspopulationen von Patient 3 oder Patient 10 (Abb. 3.42). Das Bild der großen genetischen Distanz zwischen (a) und (b)-Populationen ergab sich u.a. dann, wenn eine bisher nicht detektierbare Minorvariante unter Therapie selektiert wurde und schließlich als neue Majorpopulation dominierte. Bei Patient 7 (Abb. 3.42) wurden zu Beginn der ADF-Therapie zwei verschiedene Populationen detektiert, eine dieser beiden war nach 20 Monaten Behandlung nicht mehr nachweisbar. So etwas geschah wahrscheinlich z.B. dann, wenn sich eine Population durch geänderten Selektionsdruck nicht mehr behaupten konnte und nur noch als Minorvariante im Wirt persistierte.

Im Gegensatz dazu konnten z.B. bei Patient 8 oder 13 alle Populationen einem bestimmten Vorfahren bzw. Ursprung zugeordnet werden. Diese Entwicklung bezeichnet man auch als *ancestral polymorphism*. Dabei kam es nicht zur Selektion einer neuen Variante, vielmehr entwickelte sich eine bestehende Population, die ihren Ursprung in bestimmten Vorfahrensviren (*ancestors*) nimmt, weiter. Bei einigen Patienten lagen nach Monaten bis Jahren ADF-Therapie verschieden entwickelte HBV-Populationen nebeneinander vor. Ein Anteil der (b)-Klone ging aus der (a)-Population bzw. einzelnen Vorfahrensviren hervor, während parallel dazu eine neue Population aufkam.

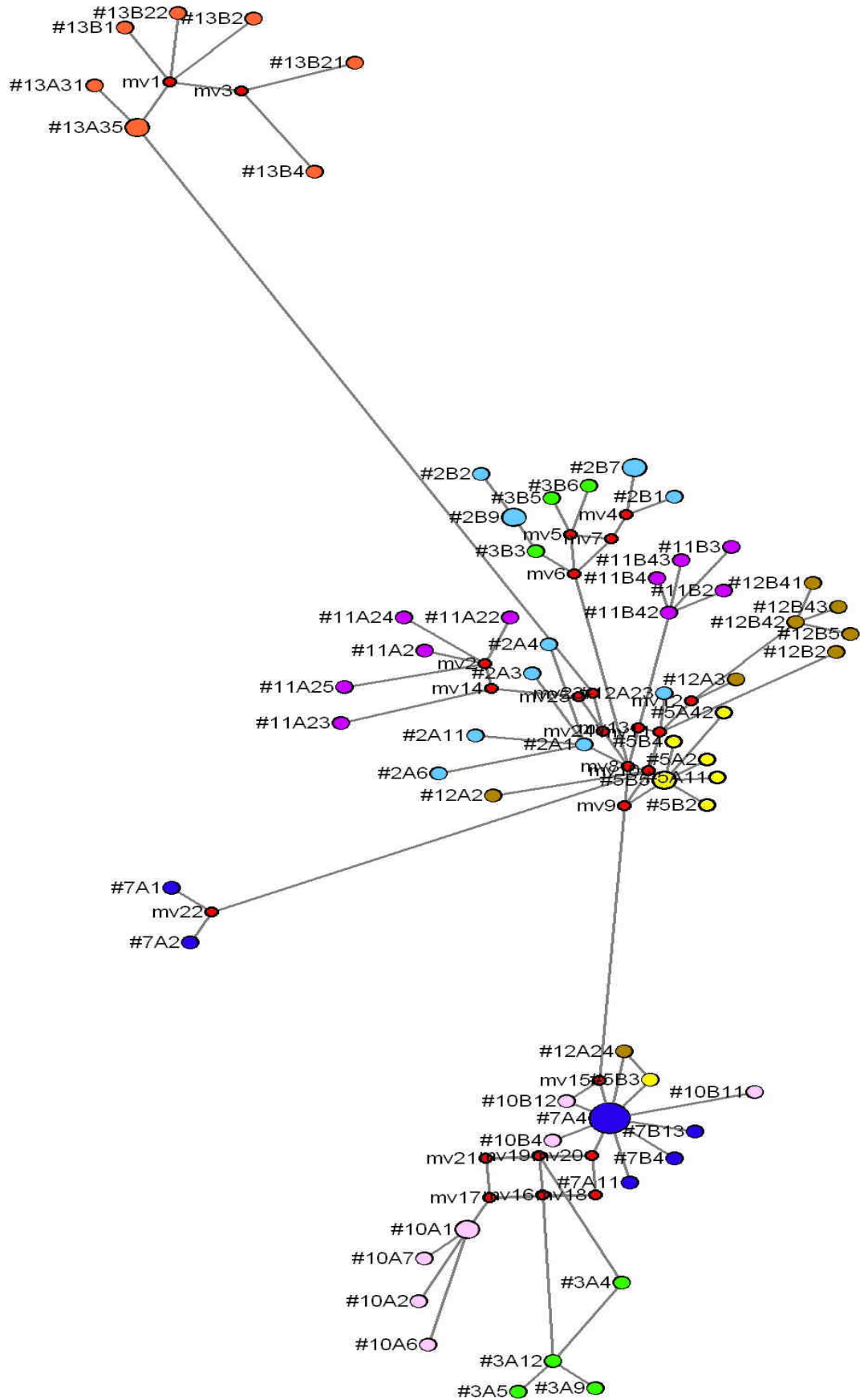


Abb. 3.42 Phylogenetisches Netzwerk aller Klone mit HBV-Genotyp D. Erklärung s. Abb. 2.41

Dies ist bei Patient 5 deutlich sichtbar: der Großteil der analysierten (b)-Klone entwickelte sich direkt aus dem durch Klon 11 (a) repräsentierten Vorfahrensvirus, während Klon 3 (b) eine vollkommen unabhängige, neue Population darstellte.

Bei einigen Patienten konnte weder von der deutlichen Selektion einer Variante noch von *ancestral polymorphism* gesprochen werden: die verschiedenen Klone waren im Netzwerk verteilt ohne abgrenzbare Gruppierungen zu bilden. Dieses Phänomen war u.a. bei den Patienten 4 und 6 zu beobachten (Abb. 2.41).

Insgesamt konnte bei sechs Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung eine resistente HBV-Majorpopulation entwickelt hatte: bei den Patienten 2, 3, 11, 12, 13 und 14 wiesen 100% der untersuchten (b)-Klone eine bekannte Adefovir-Resistenzmutation in ihrer RT-Domäne auf (Pat.2: rtI233V; Pat.3: rtI233V; Pat.11: rtN236T; Pat.12: rtN236T; Pat.13: rtA181T; Pat. 14: rtA181T).

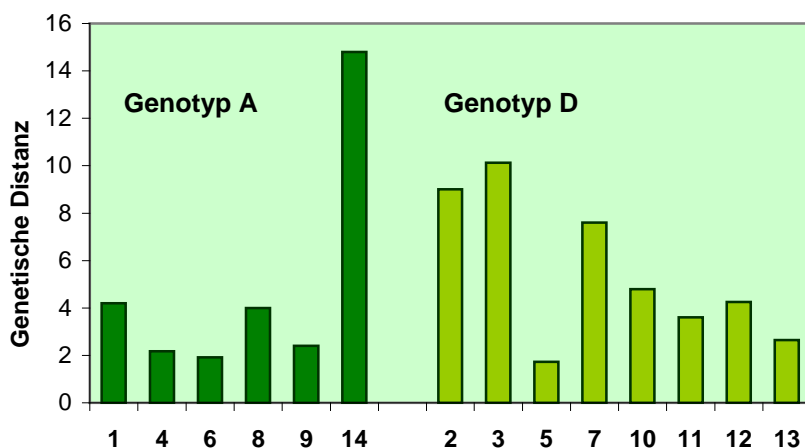
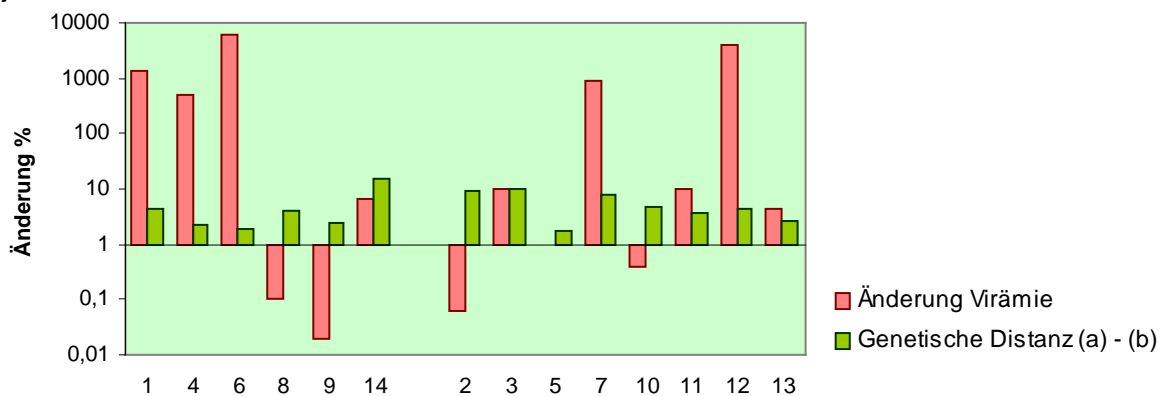


Abb. 3.43 Genetische Distanz zwischen den HBV-Populationen (a) und (b) bei 14 Patienten.  
 (a): Klone vor Beginn der ADF-Therapie  
 (b): Klone nach mehreren Monaten ADF-Therapie (17-31 Monate)

Kam es im Verlauf der Therapie zur Selektion einer neuen Majorpopulation, war die genetische Distanz zwischen (a) und (b)-Klonen erwartungsgemäß besonders groß. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist Patient 14, bei dem nach 24 Monaten Adefovirtherapie eine resistente (b)-Population mit Genotyp A detektierbar war, während bei allen (a)-Klonen Genotyp G nachgewiesen wurde. Eine große genetische Distanz zwischen (a) und (b)-Gruppen fand sich auch bei den Patienten 2 und 3 sowie 7. Bei den Patienten 2 und 3 wurde im Verlauf der Therapie eine resistente HBV-Population selektioniert und

nachgewiesen, (a) und (b)-Klone ließen sich phylogenetisch deutlich voneinander trennen. Bei Patient 7 konnte eine Population, die vor Beginn der Behandlung mit Adefovir vorhanden gewesen war, nach 20 Monaten Therapie nicht mehr detektiert werden. Auch bei Patient 10 kam es zur Selektion einer bisher nicht nachweisbaren Viruspopulation. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass eine starke Zunahme der Virämie, wie sie bei Patient 1, 4, 6, 7 und 12 vorkam, in den meisten Fällen keine Auswirkungen auf die genetische Diversität zwischen (a) und (b)-Populationen hatte. Ob es unter Adefovir zur Selektion einer neuen HBV-Majorpopulation kam, schien demnach nicht mit der Änderung der Viruslast im Serum zusammenzuhängen.

1)



2)

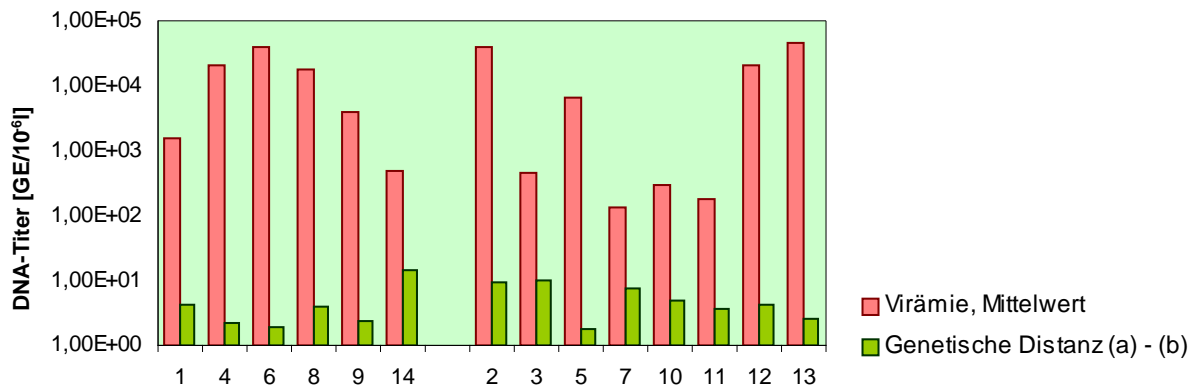


Abb. 3.44 1) Vergleich von Virämieänderung und genetischer Distanz zwischen den HBV-Populationen (a) und (b) der 14 Patienten in Verlauf der ADF-Therapie.  
 2) Vergleich von mittlerer Virämie und genetischer Distanz zwischen den HBV-Populationen (a) und (b) der 14 Patienten im Verlauf der ADF-Therapie.  
 (a): Klone vor Beginn der ADF-Therapie  
 (b): Klone nach mehreren Monaten ADF-Therapie (17-31 Monate)

Im Durchschnitt wiesen die Patienten, zwischen deren Viruspopulationen (a) und (b) eine besonders ausgeprägte genetische Distanz bestand, im Vergleich zu anderen eine eher niedrige Virämie auf. Im Gegensatz dazu imponierten die meisten der Patienten, die trotz

ADF-Therapie hochvirämisch blieben, durch genetisch relativ ähnliche (a) und (b)-Populationen. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten ist eine statistisch relevante Aussage diesbezüglich nicht möglich, eine Tendenz jedoch erkennbar.

Ebenso wie bei der genetische Distanz zwischen den (a) und (b)-Populationen, schien auch zwischen der genetische Diversität innerhalb der jeweiligen HBV-Population ((a) oder (b)) und der Virämie des Wirts kein Zusammenhang zu bestehen.

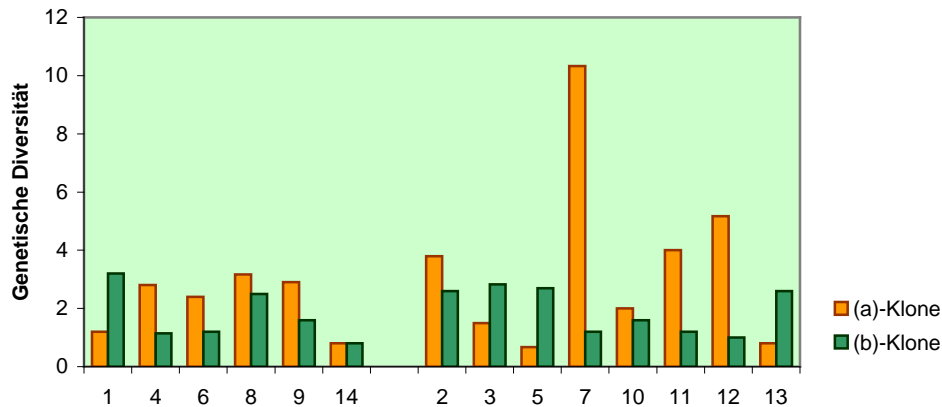


Abb. 3.45 Genetische Diversität innerhalb der (a)- und der (b)- HBV-Populationen bei 14 Patienten. (a): Klone vor Beginn der ADF-Therapie (b): Klone nach mehreren Monaten ADF-Therapie (17-31 Monate)

Bei den meisten Patienten ging im Verlauf der ADF-Therapie die genetische Diversität bzw. Streuung innerhalb der HBV-Population zurück. Lediglich bei den Patienten 1, 3, 5 und 13 war die (a)-Population wesentlich homogener (b)-Population. Die größte Diversität lag unter den (a)-Klonen von Patient 7 vor (zwei Subpopulationen, s. Abb. 3.42), gefolgt von den Patienten 11 und 12. Die sicher resistenten (b)-Populationen (Patienten 2, 3, 11, 12, 13 und 14) nahmen bezüglich ihrer inneren Homogenität keine Sonderstellung ein.

## Positive und neutrale Selektion von HBV-Klonen unter ADF-Therapie

---

Um zu ermitteln, inwiefern Hepatitis B Viren Selektionsdrücken unterliegen, kam die Methode von Nei und Gojobori zur Anwendung. Anhand eines mathematischen Algorithmus wurden die einzelnen viralen Nukleotidsequenzen (134 HBV-Klone) miteinander auf neutrale (kein nachweisbarer Selektionsdruck) oder positive (HBV ist einem Selektionsdruck ausgesetzt) Selektion verglichen. Dabei wurde das Verhältnis von Nukleotidmutationen ohne entsprechenden Aminosäure-Austausch (*silent mutations*) zu sogenannten *non-silent mutations* (mit Aminosäureaustausch) errechnet und daraus auf neutrale oder positive Selektion geschlossen. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Anzahl der Vergleiche pro Sequenz / Klon, bei denen positive bzw. neutrale Selektion vorlag ( $p \leq 0,05$ ).

Die Berechnung nach dem Algorithmus von Nei-Gojobori wurde von PD Dr. Arne Ludwig am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung in Berlin durchgeführt.



Klon	ADF-RM	neutral	positiv		Klon	ADF-RM	neutral	positiv
[ 1] #1a4		49	0					
[ 2] #1a5		31	2					
[ 3] #1a7		48	1		[ 41] #5a2		43	0
[ 4] #1a9		18	3		[ 42] #5a11		69	4
[ 5] #1a10		31	3		[ 43] #5a42		69	4
<b>Mittel</b>		<b>35,4</b>	<b>1,8</b>		<b>Mittel</b>		<b>60,3</b>	<b>2,6</b>
[ 6] #1b1		29	8		[ 44] #5b1		69	4
[ 7] #1b7		20	0		[ 45] #5b2		69	4
[ 8] #1b10		27	12		[ 46] #5b3	N236T	15	4
[ 9] #1b13	A181T	27	19		[ 47] #5b4		37	0
[ 10] #1b14		38	3		[ 48] #5b5		68	4
<b>Mittel</b>		<b>28,2</b>	<b>8,4</b>		<b>Mittel</b>		<b>51,6</b>	<b>3,2</b>
[ 11] #2a1		64	0		[ 49] #6a1		62	0
[ 12] #2a3		12	0		[ 50] #6a2		29	8
[ 13] #2a4		12	0		[ 51] #6a4		20	12
[ 14] #2a6		11	3		[ 52] #6a11		30	8
[ 15] #2a11		11	3		[ 53] #6a13		17	1
<b>Mittel</b>		<b>22</b>	<b>1,2</b>		<b>Mittel</b>		<b>31,6</b>	<b>5,8</b>
[ 16] #2b1	I233V	17	0		[ 54] #6b1		24	8
[ 17] #2b2	I233V	17	0		[ 55] #6b2	A181T	26	12
[ 18] #2b3	I233V	12	3		[ 56] #6b5		30	8
[ 19] #2b7	I233V	19	1		[ 57] #6b31		30	8
[ 20] #2b9	I233V	12	3		[ 58] #6b33		30	8
<b>Mittel</b>		<b>15,4</b>	<b>1,5</b>		<b>Mittel</b>		<b>28</b>	<b>8,8</b>
[ 21] #3a4		27	0		[ 59] #7a1		18	0
[ 22] #3a5		31	0		[ 60] #7a2		21	0
[ 23] #3a9		17	0		[ 61] #7a4		7	4
[ 24] #3a12		17	0		[ 62] #7a11		7	7
<b>Mittel</b>		<b>23</b>	<b>0</b>		<b>Mittel</b>		<b>13,25</b>	<b>2,75</b>
[ 25] #3b3	I233V	8	0		[ 63] #7b2		14	4
[ 26] #3b5	I233V	7	0		[ 64] #7b3		15	4
[ 27] #3b6	I233V	5	0		[ 65] #7b4		9	2
[ 28] #3b7	I233V	19	1		[ 66] #7b5		9	1
<b>Mittel</b>		<b>9,75</b>	<b>0,25</b>		[ 67] #7b13		9	2
					<b>Mittel</b>		<b>11,2</b>	<b>2,6</b>
[ 29] #4a1		36	0		[ 68] #8a1		44	0
[ 30] #4a3		24	9		[ 69] #8a3		41	0
[ 31] #4a4		40	6		[ 70] #8a4		47	0
[ 32] #4a5		32	2		[ 71] #8a5		29	0
[ 33] #4a13		32	2		<b>Mittel</b>		<b>40,25</b>	<b>0</b>
<b>Mittel</b>		<b>32,8</b>	<b>3,8</b>		[ 72] #8b2		31	0
[ 34] #4b1		52	0		[ 73] #8b5		65	0
[ 35] #4b2		39	6		[ 74] #8b8		43	0
[ 36] #4b3		32	2		[ 75] #8b31		34	0
[ 37] #4b5	A181T	10	9		<b>Mittel</b>		<b>43,25</b>	<b>0</b>
[ 38] #4b11		13	6					
[ 39] #4b12		39	6					
[ 40] #4b13		13	6					
<b>Mittel</b>		<b>28,28</b>	<b>5</b>					

Klon	ADF-RM	neutral	positiv		Klon	ADF-RM	neutral	positiv
[ 76] #9a1		33	0					
[ 77] #9a2		29	18		[106] #12a2		40	0
[ 78] #9a4		35	7		[107] #12a3		54	0
[ 79] #9a6		35	8		[108] #12a23		50	1
[ 80] #9a7		26	14		[109] #12a24		15	4
<b>Mittel</b>		<b>31,6</b>	<b>9,4</b>		<b>Mittel</b>		<b>39,75</b>	<b>1,25</b>
[ 81] #9b7		35	8		[110] #12b2		33	4
[ 82] #9b10		27	7		[111] #12b5	N236T	33	0
[ 83] #9b11		27	6		[112] #12b41	N236T	21	3
[ 84] #9b13		35	8		[113] #12b42	N236T	21	3
[ 85] #9b15		43	0		[114] #12b43	N236T	21	3
<b>Mittel</b>		<b>33,4</b>	<b>5,8</b>		<b>Mittel</b>		<b>25,8</b>	<b>2,6</b>
[ 86] #10a1		19	1		[115] #13a1		105	0
[ 87] #10a2		11	2		[116] #13a2		102	0
[ 88] #10a4		19	1		[117] #13a31		74	2
[ 89] #10a6		12	2		[118] #13a32		95	2
[ 90] #10a7		15	2		[119] #13a35		95	2
<b>Mittel</b>		<b>15,2</b>	<b>1,6</b>		<b>Mittel</b>		<b>94,2</b>	<b>0,83</b>
[ 91] #10b2		17	0		[120] #13b1	A181T	80	2
[ 92] #10b4		8	2		[121] #13b2	A181T	111	0
[ 93] #10b5		16	2		[122] #13b4	A181T	76	5
[ 94] #10b11		8	6		[123] #13b21	A181T	77	3
[ 95] #10b12		9	3		[124] #13b22	A181T	91	0
<b>Mittel</b>		<b>11,6</b>	<b>2,6</b>		<b>Mittel</b>		<b>87</b>	<b>2</b>
[ 96] #11a2		21	0		[125] #14a1		129	0
[ 97] #11a22		31	0		[126] #14a2		127	0
[ 98] #11a23		22	0		[127] #14a3		129	1
[ 99] #11a24		50	0		[128] #14a4		127	0
[100] #11a25		14	0		[129] #14a21		129	1
<b>Mittel</b>		<b>27,6</b>	<b>0</b>		<b>Mittel</b>		<b>128,2</b>	<b>0,4</b>
[101] #11b2	N236T	16	0		[130] #14b1	A181T	26	3
[102] #11b3	N236T	16	0		[131] #14b2	A181T	26	3
[103] #11b4	N236T	16	0		[132] #14b23	A181T	26	3
[104] #11b42	N236T	55	0		[133] #14b24	A181T	26	3
[105] #11b43	N236T	24	0		[134] #14b25	A181T	34	0
<b>Mittel</b>		<b>25,4</b>	<b>0</b>		<b>Mittel</b>		<b>27,6</b>	<b>2,4</b>

Tab. 3.20 Berechnung nach Nei-Gojobori auf positive und neutrale Selektion: Vergleich der 134 Sequenzen / Klone; Anzahl der Vergleiche, bei denen eine positive bzw. eine neutrale Selektion vorlag.  $p \leq 0,05$ .

ADF-RM: in der RT-Domäne der jeweiligen Klone lokalisierte Mutationen, die Resistenz gegenüber Adefovir vermitteln

Durch die Bildung des arithmetischen Mittels aller positiv selektierten Sequenzen eines Patienten vor und nach Adefovirtherapie können Aussagen bezüglich des Selektionsdruckes, der innerhalb eines Wirts auf die HBV-Population gewirkt hat, getroffen werden. Der auf die (a)-Klone der 14 Patienten wirkende Selektionsdruck war abhängig von der teilweise vorhergegangenen Behandlung mit Lamivudin und dem Vorhandensein von Lamivudinresistenz-Mutationen. Um den Selektionsdruck, der am Ende der Adefovirtherapie auf die (b)-Klone wirkte, abzuschätzen, war hier deshalb weniger der absolute Wert, sondern vielmehr die Differenz zwischen (a) und (b)-Klonen entscheidend. Eine Übersicht über die Ausprägung des ermittelten Selektionsdruck bei den 14 Patienten gibt Abbildung 3.46.

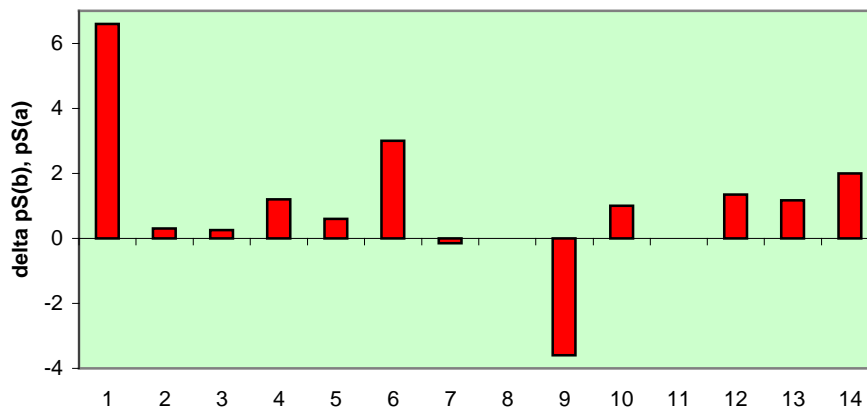


Abb. 3.46 Nach Nei-Gojobori errechneter Selektionsdrucks auf die HBV-Populationen von 14 Patienten, Vergleich der positiv selektierten Sequenzen vor [pS(a)] und nach [pS(b)] mehreren Monaten ADF-Therapie

Ein ausgeprägter Selektionsdruck bestand bei der Viruspopulation von Patient 1, gefolgt von den Patienten 6 und 14, ein vergleichsweise mäßiger Selektionsdruck bei den Patienten 12, 13, 4 und 10. Bei Patient 1 schien gerade der Klon am stärksten vom Selektionsdruck betroffen, der wahrscheinlich als einziger von fünf eine ADF-resistente Reverse Transkriptase aufwies (rtA181T). Ein ähnliches Bild bot sich auch bei den Patienten 4 und 6, bei denen – bei sonst unauffälligen RT-Domänen – lediglich jeweils bei einem Klon Resistenzen nachgewiesen wurden. Patient 14 zählte hingegen zu den Patienten, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer ADF-resistenten Majorpopulation ausgegangen werden konnte. Ähnliches galt auch für die Patienten 12 und 13, sowie für die Patienten 2, 3 und 11, wobei letztere erwartungsgemäß nur einem sehr geringen Selektionsdruck ausgesetzt waren.

Daneben entwickelten sich auch die HBV-Populationen der Patienten 5, 7, 8 und 9 scheinbar ohne äußeren Selektionsdruck. Bekannte ADF-Resistenzmutationen konnten – bis auf rtN236T in einem HBV-Klon aus Patient 5 – bei ihnen nicht detektiert werden.

Zwischen dem errechneten Ausmaß des Selektionsdrucks, der auf die HBV-Populationen der 14 Patienten einwirkte und der im Serum der Patienten vorhandenen Virämie bestand kein Zusammenhang. Ebenso konnten weder Evolutionsform (ancestral polymorphism vs. Selektion einer bestimmten HBV-Subpopulation, s.o.) noch die genetische Diversität innerhalb der viralen Gesamtpopulation mit der Ausprägung des Selektionsdrucks korreliert werden.

Zusammengefasst ergab die Berechnung nach Nei-Gojobori, dass auf die HBV-Populationen von drei Patienten eine positive Selektion gewirkt hatte, während die Hälfte der untersuchten Viruspopulationen (7 Patienten) keinem oder keinem wesentlichen Selektionsdruck ausgesetzt gewesen war.

## IV. DISKUSSION

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Serumproben von 14 chronisch Hepatitis B infizierten Patienten, die mehrere Monate lang mit Adefovir behandelt wurden, retrospektiv untersucht. Es wurden ausschließlich Patienten ausgesucht, bei denen unter Adefovir kein langfristiger Therapieerfolg gesichert werden konnte. HBV-DNA und HBsAg im Serum wurden regelmäßig kontrolliert und HB Viren aus den Seren zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (vor und nach Adefovirtherapie) kloniert und sequenziert. Insgesamt wurden die Reverse Transkriptase-Domänen von ca. 140 HBV-Klonen untereinander und mit der jeweiligen Genotyp-Referenzsequenz verglichen. Mutationen wurden sowohl quantitativ wie auch qualitativ analysiert, insbesondere unter dem Aspekt der viralen Adefovir-Resistenzvermittlung.

Es wurden Phylogenie und Evolution von Hepatitis B Viren innerhalb eines Wirts unter antiviraler Therapie retrospektiv untersucht und mit Virämie und Mutationsprofilen der Reversen Transkriptase in Zusammenhang gestellt.

### **Adefovir-Therapie, Patientenkollektiv und HBV-Mutationsanalysen**

Das Nukleotidanalogen Adefovir wurde 2003 in Deutschland für die Behandlung der chronischen Hepatitis B zugelassen und verspricht – auch nach längerer Behandlungsdauer – in vielen Fällen gute Therapieerfolge und wenig virale Resistenzbildung (Hadziyannis et al. 2005, 2006 [77, 78]; Dando et al. 2003 [79]).

Bei nicht wenigen Patienten ließ sich jedoch auch unter Adefovir ein Therapieversagen beobachten. Eine häufige Ursache für das Ausbleiben des Therapieerfolges waren Resistenzmutationen in der viralen Polymerase; bei HBV sind diese typischerweise innerhalb der Domäne der Reversen Transkriptaseaktivität (DNA-Sequenz der RT-Domäne, Teil des HBV P-Gens) lokalisiert. Durch Klonierung und Sequenzierung von HBV-Quasispezies aus dem Serum chronisch infizierter Patienten wurde zunächst das Mutationsprofil der RT-Domäne vor und während antiviraler Therapie mit Adefovir analysiert. Dabei stand vor allem die Frage im Vordergrund, inwiefern Sequenzmuster bzw. Mutationen innerhalb der Reversen Transkriptase mit Therapieresistenz korreliert werden können.

Alle 14 Patienten, deren Serumproben hier untersucht wurden, stammten aus einem Kollektiv chronisch HBV-Infizierter, die über einen längeren Zeitraum mit Adefovir behandelt wurden und dabei nur unzureichend auf die Therapie ansprachen. Bei der Hälfte der Patienten konnte unter der Behandlung mit Adefovir kein signifikanter Abfall der

Virämie verzeichnet werden, stattdessen stieg die Viruslast nicht selten noch weiter an. Bei sechs Patienten konnte die Virämie durch Adefovir zwar gesenkt werden, HBV-DNA blieb jedoch weiterhin nachweisbar. Da ein Abfall des HBV-Titers unter die Nachweisgrenze (hier: 100 GE/ml) durch Adefovirtherapie jedoch möglich und durchaus realistisch ist [124], wurde im Fall des Nichterreichens dieses Behandlungsziels hier von Therapieversagen gesprochen. In vielen Studien wird die antivirale Wirksamkeit neuer Nukleosidanaloga an einem initialen, ausgeprägten Abfall der Virämie gemessen, der Erfolg der Behandlung an der längerfristigen Unterdrückung der viralen Replikation (mindestens 6 - 12 Monate) [123]. In der aktuellen AWMF-Leitlinie wird ein Therapieerfolg als dauerhafte Senkung der Viruslast unter  $10^3$  GE/ml bzw. ein Therapieversagen als die ausbleibende Absenkung des HBV-DNA-Titers um mindestens eine Logstufe nach 3 Monaten Therapie definiert. Dabei wird zwischen primärem und sekundärem Therapieversagen (Wiederanstieg der Viruslast nach initialem DNA-Titerabfall um mindestens 1 Logstufe) unterschieden [159].

Insgesamt wurden 134 Klone auf Mutationen in der RT-Domäne der HBV-Polymerase untersucht, davon 70 Klone nach 1,5 bis 2,5 Jahren Adefovirtherapie.

Die bekannte ADF-Resistenzmutante rtN236T [81] trat bei ca. 9% der Klone nach Therapie neu auf, rtA181T bei etwa 24%. Zählte man die Klone dazu, bei denen diese Mutationen bereits vor Therapiebeginn nachweisbar waren, fanden sich rN236T und rtA181T nach Adefovirbehandlung bei insgesamt 14% bzw. 26%. Etwa 13% der Klone wiesen nach ADF-Therapie erstmalig die Mutation rtI233V auf.

Bei der am häufigsten unter Therapie neu aufgetretenen Substitution handelte es sich damit um rtA181T bzw. rtA181V, beide Varianten vermitteln bekanntermaßen Resistenz gegenüber Adefovir ([83], [125], [126]). An zweiter Stelle lagen Mutationen an Position rt53 (I53S, N53D, I53V) sowie rtY54H, mit jeweils 17% bzw. 16% aller Neumutationen (s.Tab. 3.16).

Nukleosidanaloga, gegen die Resistenzen vermittelt werden, erzeugen häufig ein typisches „Resistenzmuster“ in der RT-Domäne. Jedem dieser Medikamente können also bestimmte konservierte Bereiche zugeordnet werden, in denen die entsprechenden Resistenzmutationen bevorzugt entstehen. Lamivudin-Resistenzmutationen sind i.d.R. in den Bereichen C und B der RT-Domäne lokalisiert, die bisher gesicherten Adefovir-Resistenzmutationen hingegen in den B und D -Regionen. Entecavir, ein neues Nukleosidanalogon mit fraglicher Lamivudin-Kreuzresistenz [127], [128] erzeugt neben den „Lamivudin-Bereichen“ B und C (I169T, T184G; S202I) auch Resistenzmutationen im Bereich E (M250V) der Reversen Transkriptase.

Alle bisher bekannten Resistenzmutationen liegen in konservierten Bereichen der RT-Domäne und damit in den katalytischen Regionen der Polymerase. Dies traf auf die hier so häufig nachgewiesenen Substitutionen rt53 und rtY54H nicht zu. Aufgrund der natürlichen Variabilität des HB Virus kommt es auch ohne Selektionsdruck zu Mutationen innerhalb des Genoms [129]. In der RT-Domäne fanden sich diese besonders in den variablen Regionen, da sich Mutationen in den konservierten Bereichen häufig negativ auf die Aktivität des Enzyms auswirken. Einige Regionen der RT-Domäne schienen besonders variabel zu sein, hier fanden sich insgesamt die meisten Substitutionen. Da sich die Anzahl der Substitutionen an diesen Positionen vor und nach Therapie nicht wesentlich unterschied, handelte es sich wahrscheinlich nicht um resistenzvermittelnde Mutationen, sondern um natürliche Polymorphismen, ein Begriff, der in diesem Zusammenhang von Stuyver et al. [115] geprägt wurde.

Zusätzlich zu den bereits genannten Varianten rtN236T, rtI233V und rtA181T/V waren die konservierten Bereiche der RT-Domäne häufig an weiteren Positionen modifiziert: L80I/V und L91I (Region A), sowie N248H und verschiedene Substitutionen an den Positionen 256 und 257 (Region E). Die Verbreitung von N248H ging insgesamt unter Therapie zurück, ebenso wie die Substitutionen an den Positionen 256 und 257. Die Mutationen L80I/V und L91I, wovon erstere im Zusammenhang mit Lamivudinresistenz diskutiert wird [130], fanden sich vor Beginn der ADF-Therapie bei 1,6% bzw. 4,6% aller Klone, nach Behandlung traten sie bei 7% bzw. 8,6% der Klone auf. Im Gegensatz zu bekannten Resistenzmutationen waren rtL80I/V bzw. rtL91I insgesamt jedoch eher selten nach ADF-Therapie anzutreffen (zum Vergleich: rtI233V: 13%, rtN236T: 14%, rtA181T: 26%).

### **Modifikationen des HBs-Proteins durch Mutationen in der HBV-RT-Domäne**

Durch die Überlappung des Polymerase-Gens mit dem Gen des kleinen Hüllproteins S (HBsAg) können sich Substitutionen innerhalb der RT-Sequenz auf die Integrität des S-Proteins auswirken. Das HBsAg stellt als Oberflächenmarker der infizierten Zelle die Zielstruktur von – durch Impfung oder Infektion gebildeten – HBs-Antikörpern dar. Dabei spielt die sogenannte a-Determinante des Proteins eine besondere Rolle. Mutationen in diesem Bereich können die Antigenität des HBsAg signifikant verändern, so dass eine Antikörper-Antigen-Bindung verhindert wird [131, 132]. Diese *escape*-Mutanten können auch in erfolgreich geimpften Personen eine Hepatitis B Infektion verursachen und stellen ein gefürchtetes Gesundheitsproblem dar [133].

Insgesamt konnte bei 25 Klonen eine verkürzte S-Protein-Sequenz nachgewiesen werden, bei 15 Klonen korrelierte das Stopp-Codon im HBs-ORF mit einer Mutation in der Reversen Transkriptase. Am häufigsten war dies die Adefovir-Resistenzmutation rtA181T,

durch die das HBsAg um 45 Aminosäuren verkürzt wurde. Die für die Antigenität besonders entscheidende a-Determinante wurde dabei nicht verändert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit der HBV-Mutante rtA181T transfiziert wurden, eine deutlich geringere HBsAg Sekretion aufwiesen als die Wildtyp-Variante (ca. 1:3). Die RT-Mutation A181T führte demnach zu einer reduzierten oder ineffizienten HBsAg-Synthese bzw. Sekretion. Bruss et al. [114] konnten durch Mutationsanalysen nachweisen, dass ein an Position 172 C-terminal verkürztes HBsAg (wie es durch rtA181T entsteht) instabil ist und nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert wird – eine Erklärung für die reduzierte HBs-Sekretion der A181T-Variante.

Bei über zwei Dritteln aller Patienten zeigten sich HBV-Populationen mit einem um 10 Aminosäuren verkürzten S-Protein, allerdings handelte es sich hier primär um eine Mutation des HBs-ORF, die korrelierende Sequenz der RT-Domäne blieb unverändert. Da dieses verkürzte S-Protein bei (a)- und (b)- Klonen gleichermaßen auftrat, schien es sich hier zumindest nicht direkt um ein mit Adefovirbehandlung bzw. -Resistenz in Zusammenhang stehendes Ereignis zu handeln. Bei einem anderen Klon kam es zur Deletion einer Aminosäure – sowohl in der RT-Domäne als auch im überlappenden HBs-ORF. Im Fall eines Patienten fand sich eine HBV-Majorpopulation mit einer um neun Nukleotide verlängerten Sequenz (dreifach redundantes Codon), dadurch kam es zur Insertion eines Aminosäuren-Triplets in HBsAg und RT-Domäne. Diese dreifache Insertion wurde hier erstmalig beschrieben (NCBI Genbank Nr. DQ399006), ähnliche Variationen an dieser Position in einem HBV-Genom sind bisher nicht bekannt. Sowohl diese Deletion als auch die Insertion lagen jeweils ähnlich lokalisiert um Position 124 (RT-Domäne) bzw. 115 (S-Protein) und damit in einer Region, die – zumindest innerhalb der RT-Domäne – besonders variabel zu sein scheint (s.o.). In beiden Fällen änderte sich dadurch die Gesamtlänge des viralen Genomes.

Wie sich sekundäre Aminosäure-Substitutionen im HBsAg auf Funktionalität, Infektiösität und Replikationseffizienz des Hepatitis B Virus auswirken und ob eine Infektion durch HBV mit funktionell und strukturell modifiziertem S-Protein aufrechterhalten werden kann, ist – insbesondere im Hinblick auf Selektionsvor- bzw. -nachteile unter antiviraler Therapie – von Interesse. Bei Ko-Expression von unverändertem HBsAg könnten Defizite des modifizierten Proteins gegebenenfalls ausgeglichen werden [114]. Besonders interessant sind dabei HBs-Änderungen durch RT-Resistenzmutationen, da diese unter Therapie vermehrt selektioniert werden.



## **Phänotypisierung der Mutation rtI233V**

Da die vollständige Phänotypisierung aller hier nachgewiesenen RT-Mutationen äußerst aufwändig und im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, wurde stellvertretend eine Variante ausgewählt und *in vitro* analysiert.

Um Hinweise über die Auswirkungen der bisher unbekanntes Mutation rtI233V, die bei mehreren Patienten mit Therapieversagen – auch außerhalb des hier untersuchten Kollektivs – aufgefallen war, zu gewinnen, wurde diese HBV-Variante im Zellkultursystem phänotypisiert. Dabei wurden mit HBV-I233V-Genomen transfizierte Zellen mehrere Tage lang antiviralen Medikamenten ausgesetzt und die Menge an replikativen Intermediaten intra- und extrazellulär bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von Adefovir allein durch die Mutation rtI233V so stark reduziert wird, dass ein Therapieversagen *in vivo* durch sie hinreichend erklärt werden könnte. Dies wurde durch klinische Beobachtungen bestätigt [134, 135]. Eine Resistenz gegen die Nukleosid/tidanaloga Lamivudin oder Tenofovir wurde durch rtI233V nicht vermittelt. Die Mutation rtI233V kann unter Therapie mit Adefovir selektioniert werden, kommt aber auch natürlich, d.h. in HBV-Populationen bisher nicht behandelter Patienten vor. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass Hepatitis B Patienten bereits vor Therapiebeginn einen Adefovir-resistenten HBV-Stamm in sich tragen. Durch routinemäßig durchgeführte Sequenzierungen könnten solche Patienten rechtzeitig erkannt und einer entsprechenden Alternativtherapie zugeführt werden. Das gefährliche Risiko des zu spät erkannten Therapieversagens mit Transaminasenanstieg und zunehmender hepatischer Entzündungsaktivität könnte dann deutlich reduziert werden.

## **Patienten ohne Resistenzmutationen: andere mögliche Ursachen der Resistenz**

Innerhalb des hier untersuchten Kollektivs wurden bei 6 von 14 Patienten zum Zeitpunkt der zweiten Sequenzierung (Zeitpunkt b) ausschließlich resistente HBV-Populationen nachgewiesen, die ein Therapieversagen hinreichend erklären konnten. Ausbleibender Therapieerfolg konnte jedoch nicht immer auf bekannte Resistenzmutationen zurückgeführt werden. Da 4 von 14 untersuchten Patienten ohne nachweisbare, bekannte Resistenzmutationen trotz ADF-Therapie hochvirämisch blieben, musste in diesen Fällen eine andere Ursache des Therapieversagens diskutiert werden. Ähnliche Fälle von Patienten, bei denen auch ohne nachweisbare Resistenzmutationen ein vermindertes Ansprechen auf Adefovir beobachtet wurde, sind bereits beschrieben [136]. Dabei könnten andere, bisher nicht in diesem Zusammenhang bekannte Mutationen innerhalb

der RT-Domäne Resistenz vermittelt haben. Durch den Selektionsvorteil, den eine Resistenzmutation bietet, sollte sich die entsprechende Variante jedoch schnell als Majorpopulation innerhalb eines Wirts durchsetzen. Mit großer Wahrscheinlichkeit wäre eine solche Substitution in einer konservierten Region der RT-Domäne lokalisiert, so wie bisher alle bekannten HBV-Resistenzmutationen [137]. Bei keiner HBV-Population konnten hier Mutationen gefunden werden, auf die dies zugetroffen hätte. Denkbar wäre auch eine Resistenzvermittlung durch die Kombination einzelner RT-Mutationen. Ein charakteristisches, wiederkehrendes Kombinationsmotiv (wie z.B. M204V/L180M/V173L bei Lamivudinresistenz) konnte jedoch nicht erkannt werden – mit Ausnahme der bereits erwähnten, häufigen Polymorphismen. Bei einigen Patienten fand sich nach Behandlung mit Adefovir bei der Mehrzahl der Klone eine der Referenzsequenz (HBV-Wildtyp) entsprechende RT-Domäne (Patienten 4, 6 und 7). Bei anderen wurden nur wenige, vereinzelte Substitutionen in der RT-Domäne nachgewiesen (Patienten 1 und 10). Dennoch konnte der HBV-Titer dieser Patienten unter Therapie mit Adefovir nicht zufriedenstellend gesenkt werden, einige blieben sogar hochvirämisch (Patienten 4, 6 und 7). Gegenüber der HBV-Referenz/Wildtyp RT-Domäne besitzt Adefovir jedoch volle Wirksamkeit [138], wenn auch die  $IC_{50}$  des Medikaments zwischen den verschiedenen Genotypen geringfügig variiert [139]. Es kam also zum Therapieversagen bei Patienten, deren HBV-Majorpopulation keine Resistenzmechanismen innerhalb der RT-Domäne aufwies.

Eine weitere Möglichkeit der antiviralen Resistenz bei HBV sind Veränderungen ausserhalb der RT-Domäne, Mutationen in anderen Bereichen des Genomes. In der Regel selektioniert ein antivirales Medikament jedoch bevorzugt Mutationen innerhalb seiner Zielstruktur. So kommt es in der HIV-Therapie durch Integrase-Hemmer vermehrt zu Resistenzmutationen innerhalb der normalerweise konservierten Integrase [140], durch Behandlung mit Protease-Inhibitoren werden Resistenzmutationen innerhalb dieses Proteins selektioniert [141].

In der Therapie der chronischen Hepatitis B wurden bereits Mutationen im HBcAg (core-Protein), insbesondere in der Region des *basal core promoters* (BCP), mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lamivudin-Resistenz in Verbindung gebracht [142,143]. Ferner senken Mutationen in diesem Bereich – ebenso wie Veränderungen innerhalb der *precore* Region [144] – die Wirksamkeit von Interferon  $\alpha$ , einem immunmodulatorischen Medikament ohne unmittelbare antivirale Wirkung [145]. Auch wenn in diesen Fällen nicht von einer direkten Resistenzvermittlung gesprochen werden kann, so ist es dennoch theoretisch möglich, dass Veränderungen an anderen viralen Proteinen ein Therapieversagen begünstigen.

Unter Anbetracht des komplexen Metabolismus, den ein Nukleosidanalogen nach der Aufnahme im Körper des HBV-Patienten durchläuft, darf die Möglichkeit wirtsspezifischer Ursachen der Resistenz nicht vernachlässigt werden. Die intestinale Aufnahme von Adefovir dipivoxil erfolgt durch strukturspezifische membranöse Transportproteine der Enterozyten. Nukleotide wie Thymin und Adenin konkurrieren dabei mit Adefovir um dieses Transportsystem [146]. In der Zielzelle, dem Hepatozyten, wird Adefovir durch AMP- bzw. ADP-Kinasen in seine aktive Form, Adefovirdiphosphat überführt. Aus der HIV-Forschung ist bekannt, dass die Aktivität dieser Kinasen durch persistierend hohe intrazelluläre Konzentrationen an Nukleosidanaloga verringert wird und das Gleichgewicht der am Nukleosidstoffwechsel beteiligten Enzyme insgesamt zugunsten des NTP-Abbaus verschoben wird [147]. Aktives Adefovirdiphosphat schließlich konkurriert in der Leberzelle mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) um die virale Reverse Transkriptase, wobei die intrazelluläre Menge an dATP individuell variiert [148].

Ein weiterer Faktor, den es bezüglich des ADF-Stoffwechsels zu berücksichtigen gilt, ist die ubiquitäre Expression verschiedener Klassen zellulärer Efflux-Pumpen, der sogenannten *multidrug-resistant-proteins*, MRP [149]. Diese Proteine schleusen Monophosphatnukleoside aus der Zelle; unter anderem auch Nukleosidanaloga (MRP-Klassen 4 und 5) [150]. Der Efflux von Nukleosidanaloga aus der Zielzelle stellt ein in der Tumorthherapie bereits seit langem bekanntes Problem dar, und wird auch als Ursache von Resistenz in der HIV-Behandlung diskutiert [151]. Der Grad der MRP-Expression variiert zwischen den gleichen Zelltypen verschiedener Patienten [151]. Ein weiteres Protein, BCRP (*breast cancer resistance protein*) aus der Klasse der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) besitzt ähnliche Eigenschaften und führt *in vitro* bei zellulärer Überexpression u.a. zu Lamivudinresistenz [152].

Angesichts der vielen zellulären Faktoren, die in den Stoffwechsel der Nukleosidanaloga eingreifen, müssen individuelle wirtsspezifische Einflüsse bezüglich Wirksamkeit von und Resistenzentstehung gegenüber Adefovir unbedingt berücksichtigt werden. Durch Abbau oder Efflux von Nukleosidanaloga aus der Zielzelle könnte der notwendige therapeutische intrazelluläre Spiegel des Medikaments unterschritten und Resistenzentstehung dadurch begünstigt werden.

### **Adefovir-Therapie: Selektionsdruck auf HBV-Populationen**

Um zu ermitteln, inwiefern die HBV-Populationen der 14 Patienten Selektionsdruck ausgesetzt waren, wurde das Verhältnis der stummen zu nicht-stummen Nukleotidsubstitutionen nach Nei und Gojobori berechnet. Wirkt ein antivirales Medikament wie Adefovir auf Hepatitis B Viren ein, übt es einen Selektionsdruck auf sie

aus. Diesem Selektionsdruck kann das Virus entgehen, indem es sich durch eine Resistenzmutation an seine Umgebung anpasst. Bei jedem zweiten Patienten konnte nur wenig oder kein Selektionsdruck auf die HBV-Populationen nachgewiesen werden. Bei zwei dieser Patienten lagen keine Veränderungen in den konservierten Regionen der RT-Domäne vor, bei zwei weiteren fanden sich zwar Substitutionen, jedoch keine bekannten Resistenzmutationen.

## **Phylogenie und Evolution von Hepatitis B Viren unter Adefovir-Therapie**

Hepatitis B Viren neigen durch ihre hohe Replikationseffizienz und die Fehlerhaftigkeit der reversen Transkription von Natur aus zu einer hohen Mutationsrate [117]. Innerhalb eines Wirtes kommt es dabei im Laufe der Infektion zwangsläufig zu der Entwicklung verschiedener Quasispezies [118]. Diese typisch retrovirale Eigenschaft ist lange bekannt und – am Beispiel des Humanen Immundefizienzvirus – sehr gut erforscht.

Durch die Klonierung von HBV aus einer Serumprobe konnten im Rahmen dieser Arbeit einzelne virale Subpopulationen aufgetrennt werden. Bedingt durch die begrenzte Anzahl an untersuchten Klonen pro Patient war von weitaus mehr HBV-Quasispezies auszugehen, als durch die einzelnen Klone repräsentiert wurden. Ebenso konnte das tatsächliche prozentuale Verhältnis der Subpopulationen zueinander – also die Zusammensetzung der HBV-Gesamtpopulation – sicher nicht repräsentativ durch die Menge der analysierten Klone wiedergegeben werden. Trotz des Stichprobenfehlers sollte aus den untersuchten Klonen jedoch auf eine Major- oder Minorpopulation zu schließen gewesen sein.

Bei der Evolution der HBV-Populationen konnten zwei Schemata unterschieden werden: Durch den vom Nukleosidanalogen ausgeübten Selektionsdruck wurde der Großteil der HBV-Replikation unterdrückt, während bisher nicht nachweisbare, einzelne resistente Stämme sich als Majorpopulation etablieren konnten. Diese Dynamik wurde bereits von Yim et al. in einer HBV-Mutationsanalyse bei Adefovir-behandelten Patienten beobachtet [69]. Die resistenten Viren können – gegebenenfalls als Minorvariante – bereits vor Therapiebeginn vorhanden gewesen sein. In diesem Fall zeigte sich im phylogenetischen Netzwerk nach Therapie eine neu aufgekommenen HBV-Population; zwischen ihr und der Ausgangspopulation (vor Therapiebeginn) bestand eine große genetische Distanz. Diese Selektion einer bisher nicht nachweisbaren HBV-Population schien u.a. bei den Patienten 3 und 10 vorzuliegen.

Im Gegensatz dazu war bei einigen Patienten eine direkte genetische Verwandtschaft zwischen der nach ADF-Therapie vorhandenen und der ursprünglichen HBV-Population zu erkennen. Unter der antiviralen Behandlung entwickelte sich die bestehende

Population weiter (und erwarb ggf. Resistenzen), man spricht von ancestralem Polymorphismus d.h. der mehr oder weniger linearen Entwicklung aus einer Ur-Population, die u.a. bei den Patienten 8 und 13 vorlag.

Auch das Zusammenspiel beider Evolutionsformen innerhalb eines Patienten war möglich (Patient 5). Sowohl die Selektion von neuen Populationen als auch ancestraler Polymorphismus entwickelten sich unabhängig von der Existenz antiviraler Resistenzmutationen, d.h. beide Arten der Evolution konnten sowohl bei HBV-Populationen mit ADF-sensitiver RT-Domäne als auch bei Populationen mit Resistenzmutationen vorkommen. Die vorherrschende Evolutionsform des HBV-Pools eines Patienten schien sich weder auf die Höhe der Virämie auszuwirken, noch von ihr beeinflußt zu werden, zwischen diesen beiden Parametern bestand kein Zusammenhang. Die unterschiedliche evolutionäre Entwicklung viraler Quasispezies bei verschiedenen Patienten ist aus der HIV-Forschung bereits bekannt, dabei scheinen inter-individuelle Unterschiede eine Rolle zu spielen (Liu et al. 1997 [90]). In Studien konnte bei einigen Patienten lediglich von einer Viruslatenz (ohne nennenswerte Weiterentwicklung, d.h. Evolution) gesprochen werden [119], während bei anderen auch bei niedrigen Replikationsraten durchaus Evolution, d.h. genetische „Mobilität“ in der Virusgesamtpopulation beobachtet wurde [120,121].

Wodurch der Evolutionsweg einer Viruspopulation bestimmt wurde und ob das jeweilige RT-Domänen-Mutationsprofil mit seinen multiplen Auswirkungen auf Replikationseffizienz und Mutagenität der betroffenen HBV-Variante [122] eine Rolle spielte, muss noch weiter untersucht werden.

Die genetische „Streuung“ innerhalb der HBV-Gesamtpopulation eines Patienten (Gesamtheit der (a) bzw. (b)-Klone); war von der Art der Evolution unabhängig. Ebenso bestand kein Unterschied zwischen hoch- und niedrigvirämischen Patienten, das Ausmaß des Therapieversagens schien sich nicht auf die genetische Divergenz der viralen Population auszuwirken. Unabhängig davon kam es im Verlauf der Adefovirtherapie in den meisten Fällen zu einem Rückgang der Populationsdivergenz, d.h. die (b)-Populationen waren insgesamt genetisch homogener als die (a)-Populationen. Eine vorausgegangene Lamivudin-Behandlung schien dabei keinen Einfluß zu haben. Ob es sich bei diesen Beobachtungen um ein generelles Phänomen viraler Populationsdynamik unter Adefovirbehandlung handelt, kann an dieser Stelle noch nicht beantwortet werden.

---

Die Weiterentwicklung und Erforschung neuer Nukleosidanaloga geht mit der zunehmenden Etablierung dieser neuen antiviralen Medikamente als unverzichtbarer Bestandteil der Therapie der chronischer Hepatitis B einher. Trotz des zur Zeit

bestehenden Mißverhältnis zwischen der großen Masse der HBV-Infizierten in Entwicklungs- bzw. Schwellenländern und der Verfügbarkeit neuer Therapien fast ausschließlich in unseren Industriestaaten, werden Nukleosidanaloga in Zukunft insgesamt vermehrt eingesetzt werden. Generika, die nach Ablauf der ersten Lizenzen in den Handel kommen werden, könnten auch in ärmeren Regionen der Welt zur Anwendung kommen: Chinas Generika-Industrie wächst stetig und gewinnt dadurch als Pharma-Markt für ärmere Nationen zunehmend an Bedeutung [153, 154].

Mit der Ausweitung der Nukleosidanaloga-Therapie wird das Problem der Resistenzentstehung weiterhin an Bedeutung gewinnen und stärker in den Fokus der klinischen Hepatitis B - Forschung rücken. Resistente HBV-Stämme stellen eine potentielle Bedrohung für den Therapieerfolg jedes antiviral behandelten Patienten dar. Dabei reicht eine einzelne Aminosäuresubstitution in der viralen Reversen Transkriptase bereits aus, um die Wirksamkeit eines Medikamentes drastisch zu vermindern.

Resistenzmutationen bedrohen jedoch nicht nur den Therapieerfolg eines Patienten, sondern können durch Veränderungen des RT-überlappenden HBs-Gens die Antigenität des kleinen Hüllproteins und damit die Wirksamkeit von Impfung und HB-Immunglobulinen beeinträchtigen. Dabei geht es nicht nur um die Gefahr der Entstehung von „escape“- Mutanten, vor denen kein Impfschutz mehr besteht. Veränderte Epitope innerhalb des HBsAg können zudem die HBV-Diagnostik erschweren, und so zu verschleierten oder okkulten Hepatitis B -Infektionen führen [155] – mit entsprechender Gefährdung sowohl für den Patienten wie auch für seine Umwelt.

Die individuelle Zusammensetzung der im Wirt vorhandenen HBV-Populationen, die unterschiedlichen Resistenzmutationen und die zunehmenden Verfügbarkeit verschiedener Nukleosidanaloga sprechen für eine stärkere Individualisierung der Therapie. Die Kombination mehrerer antiviraler Wirkstoffe, angepasst an das Virusspektrum des Patienten, sowie regelmäßige Sequenzierungen sind ein fester Bestandteil der HIV-Therapie. Entsprechende Therapieschema für die Behandlung der chronischen Hepatitis B wurden mehrfach gefordert (Loomba et al 2007 [156], Delaney et al. 2004 [51], Karayiannis 2003 [52]), und setzen sich nun zunehmend durch, in Deutschland z.B. empfiehlt die aktuelle AWMF-Leitlinie in bestimmten Situationen den Einsatz einer Kombinationstherapie.

Nicht zuletzt müssen neben viralen auch wirtsspezifische Resistenzen bei der HBV-Therapie mit Nukleosidanaloga erwogen werden. Insgesamt zeigte das hier untersuchte Patientenkollektiv, dass Adefovir-Resistenz in vielen Fällen durch Resistenzmutationen in der viralen RT-Domäne nicht hinreichend erklärt wird. Es ist durchaus möglich, dass der Stellenwert wirtsspezifischer Resistenzfaktoren und die Notwendigkeit ihrer genauen Erforschung bisher unterschätzt wurde.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

---

Nukleosidanaloga haben sich in den letzten Jahren zu einer wichtigen Säule in der Therapie chronischer Hepatitis B etabliert. Der langfristige Therapieerfolg wird jedoch häufig durch die Selektion resistenter Virusmutanten verhindert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Resistenzmechanismen unter Therapie mit dem Nukleotidanalogen Adefovir. Dazu wurden Serumproben von 14 Patienten mit chronischer Hepatitis B, bei denen die Viruslast durch Adefovir langfristig nicht unter  $10^3$  Genomäquivalente/ml gesenkt werden konnte, retrospektiv untersucht. Im Fokus standen dabei Virämie sowie Mutationsprofile der reversen Transkriptase-Domäne (RT-Domäne) des Virus und dessen phylogenetische Entwicklung unter Therapie.

Bei der hier am häufigsten unter Adefovirtherapie neu aufgetretenen Mutation der RT-Domäne handelte es sich um A181T (24%), gefolgt von Substitutionen an Position 53 (17%) sowie den Mutationen Y54H (16%), I233V (13%) und N236T (9%). Adefovir-Resistenzmutationen traten nur in den konservierten B- und D-Regionen der RT-Domäne auf, typische Mutationskombinationen, wie sie etwa bei Lamivudin-Resistenz beobachtet werden, kamen nicht vor. Durch die *in vitro*-Phänotypisierung der Mutation rI233V konnte erstmals gezeigt werden, dass diese HBV-Variante Resistenz gegen Adefovir vermittelt.

Mittels phylogenetischer Netzwerke und Stammbäume konnten Evolutionsformen und -dynamiken von HBV-Populationen innerhalb eines Wirtes unter Adefovir-Therapie untersucht werden. Es zeigte sich, dass virale Populationen vor und nach Adefovir-Therapie in den meisten Fällen phylogenetisch deutlich voneinander abgrenzbar waren.

Die genetische Divergenz innerhalb der HBV-Gesamtpopulation eines Wirtes entwickelte sich unabhängig von Virämie oder Therapieresistenz, nahm in Verlauf der Adefovirtherapie jedoch in der Regel ab. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass weder die Höhe der Virämie noch das Vorkommen von Resistenzmutationen Einfluss auf die Evolutionsform der HBV-Populationen hatte.

In dieser Arbeit konnte durch die *in-vitro*-Phänotypisierung der HBV-Variante rI233V demonstriert werden, dass bereits einzelne Substitutionen in der RT-Domäne des HB Virus ein Therapieversagen bedingen können. Es zeigte sich jedoch ebenfalls, dass einige Patienten unter Adefovir-Therapie hochvirämisch blieben, ohne dass Mutationen in der RT-Domäne ihrer HBV-Populationen nachweisbar waren. Bei jedem zweiten Patienten konnte trotz Adefovirtherapie kein Selektionsdruck auf die HBV-Populationen nachgewiesen werden (Berechnung nach Nei-Gojobori).

Die vorliegende Arbeit liefert damit Hinweise, dass bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten ein Therapieversagen nicht ausreichend durch Resistenzmutationen erklärt werden kann, so dass neben anderen viralen Mechanismen vor allem auch eine wirtsspezifische Resistenzvermittlung postuliert werden muss.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] World Health Organization, Fact sheet No.204, October 2000
- [2] Renz-Polsterer H., Krautzig S., Braun J. (2004) Basislehrbuch Innere Medizin, Kapitel 7.5.3 K.
- [3] Tang H., Oishi N., Kaneko S., Murakami S. (2006) Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Science* 97/10: 977-983
- [4] Kekulé A.S., Lauer U., Weiss L., Luber B., Hofschneider P.H. (1993) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 361/6414: 742-745
- [5] Su J.M., Lai X.M., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Yen S.H., Chang F.Y., Lee S.D., Lee W.P. (2007) X protein of hepatitis B virus functions as a transcriptional corepressor on the human telomerase promoter. *Hepatology* 46/2: 402-413
- [6] Bartholomeusz A., Tehan B.G., Chalmers D.K. (2004) Comparisons of the HBV and HIV polymerase and antiviral resistance mutations. *Antiviral therapy* 9/2: 149-160
- [7] Radziwill G., Tucker W., Schaller H. (1990) Mutational Analysis of the Hepatitis B Virus P Gene Product: Domain Structure and RNase H Activity. *Journal of Virology* 64/2: 613-620
- [8] Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* 8/12: 3867-3874
- [9] Funk A., Mhamdi M., Lin L., Will H., Sirma H. (2004) Itinerary of Hepatitis B Viruses: Delineation of Restriction Points Critical for Infectious Entry. *Journal of Virology* 78/15: 8289-8300
- [10] Fung S.K., Lok A.S.F. (2004) Drug Insight: nucleoside and nucleotide analog inhibitors for hepatitis B. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 1: 90-97
- [11] Le Bouvier G.L., McCollum R.W., Hierholzer W.J., Irwin G.R., Krugman S., Giles J.P. (1972) Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *Journal of the American Medical Association* 222/8: 928-930
- [12] Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. (1988) Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *Journal of General Virology* 69: 2575-2583
- [13] Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd A. H. (2002) Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology* 83: 1267-1280
- [14] Norder H., Couroucé A-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S-D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. (2004) Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBsAg Subtypes. *Intervirology* 47: 289-309



- [15] Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. (2002) Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology* 83: 2059-2073
- [16] Bowyer S.M., Sim J.G. (2000) Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *Journal of General Virology* 81/2: 379-392
- [17] Arguin P.M., Kozarsky P.E., Navin A.W. (eds)/ Centers for Disease Control and Prevention (2005) Prevention of Specific Infectious Diseases: Hepatitis, viral, Type B. In: *Health Information for International Travel 2005-2006*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service
- [18] Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. (2000) Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118/3: 554-559
- [19] Sugauchi F., Chutaputti A., Orito E., Kato H., Suzuki S., Ueda R., Mizokami M. (2002) Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17/6: 671-676
- [20] Westland C., Delaney W. IV, Yang H., Chen S.-S., Marcellin P., Hadziyannis S., Gish R., Fry J., Brosgart C., Gibbs C., Miller M., Xiong S. (2003) Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 125/1: 107-116
- [21] Zöllner B., Petersen J., Schröter M., Laufs R., Schoder V., Feucht H.-H. (2001) 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *The Lancet* 357: 934-935
- [22] Park S.G., Kim Y., Park E., Ryu H.M., Jung G. (2003) Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *European Journal of Biochemistry* 270: 2929–2936
- [23] Sheldon J., Rodès B., Zoulim F., Bartholomeusz A., Soriano V. (2006) Mutations Affecting the Replication Capacity of the Hepatitis B Virus. *Journal of Viral Hepatitis* 13/7: 427-434
- [24] Brunetto M.R., Rodriguez U.A., Bonino F. (1999) Hepatitis B Virus Mutants. *Intervirology* 42/2-3: 69-80
- [25] Burda M.R., Günther S., Dandri M., Will H., Petersen J. (2001) Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Research* 52: 125-138
- [26] Torresi J. (2002) The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of Hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 97-106
- [27] Chisari F., Ferrari C. (1995) Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology* 13: 29-60
- [28] Chang J.J., Lewin S.R. (2007) Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Immunology and Cell Biology* 85/1, 16-23

- [29] Tong S.P., Brotman B., Li J.S., Vitvitski L., Pascal D., Prince A.M., Trépo C. (1991) In vitro and in vivo replication capacity of the precore region defective hepatitis B virus variants. *Journal of Hepatology* 13/4: 68-73
- [30] Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J., Makris A., Thomas H.C. (1989) Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2/8663: 588-591
- [31] Zhang P., McLachlan A. (1994) Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology* 202/1: 430-440
- [32] Bouchard M.J., Schneider R.J. (2004) The Enigmatic X Gene of Hepatitis B Virus. *Journal of Virology* 78/23: 12725-12734
- [33] Hunt C.M., McGill J.M., Allen M.I., Condreay L.D. (2000) Clinical relevance of Hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 31/5: 1037-1044
- [34] Günther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H. (1999) Naturally occurring hepatitis B virus variants. *Advances in Virus Research* 52: 25-105
- [35] Lok A.S., Akarca U.S., Greene S. (1995) Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology*. 21/1: 19-24.
- [36] Locarnini S. (2005) Molecular Virology and the Development of Resistant Mutants: Implications for therapy. *Seminar in Liver Disease* 25: 9-19
- [37] Chen Y.C., Delbrook K., Dealwis C., Mimms L., Mushahwar I.K., Mandecki W. (1996) Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93:1997-2001.
- [38] Roggendorf M., Roß S. (2004) Definition und Diagnostik der akuten und chronischen Hepatitis B. 679-681  
 Niederau C. (2004) Indikationsstellung zur Therapie der chronischen Hepatitis B und D 682-686  
 Manns M.P., Caselmann W.H., Wiedmann K.H., Wedemeyer H. (2004) Standardtherapie der chronischen Hepatitis B  
 Aus: Diagnostik, Verlauf und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten in Zusammenarbeit mit dem Kompetenznetz Hepatitis. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 42/8: 677-730
- [39] van Zonneveld M., Honkoop P., Hansen B.E., Niesters H.G.M., Murad S.D., de Man R.A., Schalm S.W., Janssen H.L.A. (2004) Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 39/3: 804-810
- [40] Hadziyannis S., Bramou T., Makrid A., Moussoulis G., Zignego L., Papaioannou C. (1990) Interferon alfa-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic active hepatitis type B. *Journal of Hepatology* 11/1: 133-136
- [41] Realdi G., Fattovich G., Pastore G., Caredda F., Noventa F., Santantonio T., Moroni M., Criscuolo D., Maladorno D., Rugge M. (1990) Problems in the management of chronic hepatitis B with interferon: experience in a randomized, multicentre study. *Journal of Hepatology* 11/1: 129-132

- [42] Alexander G.J., Brahm J., Fagan E.A., Smith H.M., Daniels H.M., Eddleston A.L., Williams R. (1987) Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 2/8550: 66-69.
- [43] Dienstag J.L., Perrillo R.P., Schiff E.R., Bartholomew M., Vicary C., Rubin M. (1995) A Preliminary Trial of Lamivudine for Chronic Hepatitis B Infection. *New England Journal of Medicine* 333/25: 1657-1661
- [44] Lai C.-L., Chien R.-N., Leung N.W.Y., Chang T.-T., Guan R., Tai D.-I., Ng K.-Y., Wu P.-C., Dent J.C., Barber J., Stephenson S.L., Gray D.F. for The Asia Hepatitis Lamivudine Study Group (1998) A One-Year Trial of Lamivudine for Chronic Hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 339/2: 61-68
- [45] Lampertico P., Del Ninno E., Manzin A., Donato M.F., Rumi M.G., Lunghi G., Morabito A., Clementi M., Colombo M. (2003) A randomized, controlled trial of a 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum. *Hepatology* 26/6: 1621-1625
- [46] Cooksley W. G. E., Piratvisuth T., Lee S.-D., Mahachai V., Chao Y.-C., Tanwandee T., Chutaputti A., Yu Chang W., Zahm F. E., Pluck N. (2003) Peginterferon  $\alpha$ -2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis* 10/4: 298-305
- [47] Stauber R. (2004) Therapie der chronischen Hepatitis B. *J. Gastroenterol. Hepatol. Erkr.* 2: 12-15
- [48] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting M. (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8.Auflage, Kap. 6.7.1: 656-657
- [49] Shepard C.W., Simard E.P., Finelli L., Fiore A.E., Bell B.P. (2006) Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiologic Reviews* 28: 112-125
- [50] Neue Impfpfehlungen der STIKO am Robert-Koch-Institut (Juli 2004)
- [51] Delaney IV. W.E., Yang H., Miller M.D., Gibbs C.S., Xiong S. (2004) Combinations of Adefovir with Nucleoside Analogs Produce Additive Antiviral Effects against Hepatitis B Virus in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48/10: 3702-3710
- [52] Karayiannis P. (2003) Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 761-785
- [53] Löffler G. (2001) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, 4.Auflage, Kap.11.1
- [54] Juel-Jensen B. E., MacCallum F.O. (1964) Treatment of Herpes Simplex Lesions of the Face with Idoxuridine: Results of a Double-blind Controlled Trial. *British Medical Journal* 2/5415: 987-988.
- [55] Gilead Science: (2006) HEPSERA® (Adefovir dipivoxil). Produktinformation.

- [56] De Clercq E. (2003) Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 16/4: 569-596
- [57] Wong D.K., Yuen M.F., Ngai V.W., Fung J., Lai C.L. (2006) One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antiviral Therapy* 11/7: 909-916
- [58] Delmas J., Schorr O., Jamard C., Gibbs C., Trépo C., Hantz O., Zoulim F. (2002) Inhibitory Effect of Adefovir on Viral DNA Synthesis and Covalently Closed Circular DNA Formation in Duck Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes In Vivo and In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46/2: 425-433
- [59] Qaqish R.B., Mattes K.A., Ritchie D.J. (2003) Adefovir dipivoxil: A new antiviral agent for the treatment of Hepatitis B Virus infection. *Clinical Therapeutics* 25 no. 12: 3084-3099
- [60] Chin R., Locarnini S. (2003) Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Reviews in Medical Virology* 13: 255-272
- [61] Reid G., Wielinga P., Zelcer N., De Haas M., Van Deemter L., Wijnholds J., Balzarini J., Borst P. (2003) Characterization of the Transport of Nucleosid Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology* 63: 1094-1103
- [62] Locarnini S., Mason W.S., (2006) Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *Journal of Hepatology* 44: 422-431
- [63] Zhang Y.-Y., Summers J. (2000) Low Dynamic State of Viral Competition in a Chronic Avian Hepadnavirus Infection. *Journal of Virology* 74/11: 5257-5265
- [64] Seeger C., Mason W.S. (2000) Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64/1: 51-68
- [65] Protzer U., Nassal M., Chiang P.-W., Kirschfink M., Schaller H. (1999) Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96/19: 10818-10823
- [66] Nowak M.A., Bonhöffer S, Hill A.M., Böhme R., Thomas H.C., McDade H. (1996) Viral Dynamics in Hepatitis B Virus Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 4398-4402
- [67] Das K., Xiong X., Yang H., Westland C.E., Gibbs C.S., Sarafianos S.G., Arnold E. (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: 4771-4779
- [68] Ono-Nita S.K., Kato N., Shiratori Y., Masaki T., Lan K.-H., Carrilho F.J., Omata M. (1999) YMDD Motif in Hepatitis B Virus DNA polymerase influences on replication and Lamivudin resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 29: 939-945
- [69] Yim H.J., Hussain M., Liu Y., Wong S.N., Fung S.K., Lok A.S.F. (2006) Evolution of Multi-Drug Resistant Hepatitis B Virus During Sequential Therapy. *Hepatology* 44: 703-712

- [70] Chayama K., Suzuki Y., Kobayashi Ma., Kobayashi Mi., Tsubota A., Hashimoto M., Miyano Y., Koike H., Kobayashi Mar., Koida I., Arase Y., Saitoh S., Murashima N., Ikeda K., Kumada H (1998) Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 27/6: 1711-1716
- [71] Melegari M., Scaglioni P.P., Wands J.R. (1998) Hepatitis B Virus mutants associated with 3TC and Famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27: 628-633
- [72] Delaney W.E., Yang H., Westland C.E., Das K., Arnold E., Gibbs C.S., Miller M.D., Xiong S. (2003) The Hepatitis B Virus Polymerase mutation rtV173L is selected during Lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *Journal of Virology* 77/21: 11833-11841
- [73] Leung N. (2002) Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *Journal of Gastroenterol Hepatology* 17/4: 409-14
- [74] Marcellin P., Chang T.T., Lim S.G., Tong M.J., Sievert W., Shiffman M.L., Jeffers L., Goodman Z., Wulfsohn M.S., Xiong S., Fry J., Brosgart C.L.; Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. (2003) Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 348/9: 808-816
- [75] Westland C.E., Yang H., Delaney IV W.E., Gibbs C.S., Miller M.D., Wulfsohn M., Fry J., Brosgart C.L., Xiong S. for the 437 and 438 Study Teams. (2003) Week 48 Resistance Surveillance in Two Phase 3 Clinical Studies of Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 38: 96-103
- [76] Benhamou Y, Thibault V, Vig P, Calvez V, Marcelin AG, Fievet MH, Currie G, Chang CG, Biao L, Xiong S, Brosgart C, Poynard T. (2006) Safety and efficiency of adefovir dipivoxil in patients infected with lamivudin-resistant hepatitis B and HIV-1. *Journal of Hepatology* 44/1: 62-67.
- [77] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Brosgart CL, Borroto-Esoda K, Arterburn S, Chuck SL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. (2006) Long-Term Therapy With Adefovir Dipivoxil for HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B for up to 5 Years. *Gastroenterology* 20 (epub ahead of print)
- [78] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. (2005) Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 352/26: 2673-2681.
- [79] Dando T., Plosker G. (2003) Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 63/20: 2215-2234.
- [80] Lee YS, Suh DJ, Lim YS, Jung SW, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Yoo W, Kim SO. (2006) Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 43/6: 1385-1391.

- [81] Angus P, Vaughan R., Xiong S., Yang H., Delaney W., Gibbs C., Brosgart C., Colledge D., Edwards R., Ayres A., Bartholomeusz A., Locarnini S. (2003) Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 125/2: 292-297
- [82] Yadav V., Chu C.K. (2004) Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 4313-4317
- [83] Lacombe K., Ollivet A., Gozlan J., Durantel S., Tran N., Girard P-M, Zoulim F. (2006) A novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir but not to tenofovir in an HIV-hepatitis B virus-co-infected patient. *AIDS* 20/17: 2229-2231
- [84] Yatsuji H., Noguchi C., Hiraga N., Mori N., Tsuge M., Imamura M., Takahashi S., Iwao E., Fujimoto Y., Ochi H., Abe H., Maekawa T., Tateno C., Yoshizato K., Suzuki F., Kumada H., Chayama K. (2006) Emergence of a Novel Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Variant with a Substitution Outside the YMDD Motif. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50/11: 3867-3874
- [85] Leitner T., Escanilla D., Franzen C., Uhlen M., Albert M. (1996) Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10864-10869
- [86] Blanchard A., Ferris S., Chamaret S., Guétard D., Montagnier L. (1998) Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. *Journal of Virology* 72/5: 4537-4540
- [87] Metzker M.L., Mindell D.P., Liu X-M., Ptak R.G., Gibbs R.A., Hillis D.M. (2002) Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99/22: 14292-14297
- [88] Connor R.I., Sheridan K.F., Ceradini D., Choe S., Landau N.R. (1997) Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1-Infected Individuals. *The Journal of Experimental Medicine* 185/4: 621-628
- [89] Ganeshan S., Dickover R.E., Korber B.T.M., Bryson Y.J., Wolinsky S.M. (1997) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Evolution in Children with Different Rates of Development of Disease. *Journal of Virology* 71/1: 663-677
- [90] Liu S.-L., Schacker T., Musey L., Shriner D., McElrath M.J., Corey L., Mullins J.I. (1997) Divergent Patterns of Progression to AIDS after Infection from the same Source: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution and Antiviral Responses. *Journal of Virology* 71/6: 4284-4295
- [91] Kolber M.A. (2007) Development of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy: does competitive advantage drive evolution. *AIDS Reviews* 9/2: 68-74
- [92] Osiowy C., Giles E., Tanaka Y., Mizokami M., Minuk G.Y. (2006) Molecular Evolution of Hepatitis B Virus over 25 Years. *Journal of Virology* 80/21: 10307-10314

- [93] Whalley S.A., Brown D., Webster G.J.M., Jacobs R., Reignat S., Bertoletti A., Teo C.-G., Emery V., Dusheiko G.M. (2004) Evolution of hepatitis B virus during primary infection in humans: Transient generation of cytotoxic T-cell mutants. *Gastroenterology* 127/4: 1131-1138
- [94] Hannoun C., Horal P., Lindh P. (2000) Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *Journal of General Virology* 81: 75-83
- [95] Nei M., Gojobori T. (1986) Simple Methods for Estimating the Numbers of Synonymous and Nonsynonymous Nucleotide Substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3/5: 418-426
- [96] Crandal K.A., Kelsey C.R., Imamich H., Lane H.C., Salzman N.P. (1999) Parallel Evolution of Drug Resistance in HIV: Failure of Nonsynonymous/Synonymous Substitution Rate Ratio to Detect Selection. *Molecular Biology and Evolution* 16/3: 372-382
- [97] Günther S., Li B-C., Miska S., Krüger D.H., Meisel H., Will H. (1995) A Novel Method for Efficient Amplification of Whole Hepatitis B Virus Genomes Permits Rapid Functional Analysis and Reveals Deletion Mutants in Immunosuppressed Patients. *Journal of Virology* 69/9: 5437-5444
- [98] Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Sugino, Y., Nishioka, K. (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Research* 11/6: 1747-1757
- [99] Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P. (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281/5733: 646-650
- [100] Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R. (2000) A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 81/1: 67-74
- [101] Adefovir Therapy Reduces Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Levels in Chronic HBV Patients. (2004) Internet Conference Report, Digestive Disease Week, May 2004; New Orleans, Louisiana
- [102] Manesis E.K., Hadziyannis E.S., Angelopoulou O.P., Hadziyannis S.J. (2007) Prediction of treatment-related HbsAg loss in HbeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HbsAg levels. *Antiviral Therapy* 12/1: 73-82
- [103] Heintges T., Häussinger D. (2006) Hepatitis B. Infektion – Therapie – Prophylaxe. Thieme Verlag; Kapitel 4
- [104] Bartholomeusz A, Yuen L, Ayres A, Locarnini S. (2006) SeqHepB: a sequence analysis program and relational database system for hepatitis B virus mutations in HBV and HIV-HBV coinfecting patients. Abstracts of the XV International Drug Resistance Workshop; June 13-17, 2006; Sitges, Spain. Abstract 6.
- [105] Bartholomeusz A., Locarnini S. (2006) Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *Journal of Medical Virology* 78: 52-55

- [106] Schildgen O., Fiedler M., Dahmen U., Li J., Lohrengel B., Lu M., Roggendorf M. (2006) Fluctuation of the cytokine expression in the liver during the chronic woodchuck hepatitis virus (WHV) infection is not related to viral load. *Immunology Letters* 102/1: 31-37
- [107] Peters M.G., Hann H.W., Martin P., Heathcote E.J., Buggisch P., Rubin R., Bourliere M., Kowdley K., Trepo C., Gray D.F., Sullivan M., Kleber K., Ebrahimi R., Xiong S., Brosgart C.L. (2004) Adefovir dipivoxil alone or in combination with Lamivudine in patients with Lamivudine-resistant chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 126/1: 91-101
- [108] Zöllner B., Petersen J., Puchhammer-Stöckl E., Kletzmayr J., Sterneck M., Fischer L., Schröter M., Laufs R., Feucht H.H. (2004) Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 39/1: 42-50
- [109] Brunelle M.-N., Jacquard A.-C., Pichoud C., Durantel D., Carrouée-Durantel S., Villeneuve J.-P., Trépo C., Zoulim F. (2005) Susceptibility to Antivirals of a Human HBV Strain With Mutations Conferring Resistance to Both Lamivudine and Adefovir. *Hepatology* 41:1391-1398
- [110] Chudy M., Schmidt M., Czudai V., Scheiblauer H., Nick S., Mosebach M., Hourfar M.K., Seifried E., Roth W.K., Grünelt E., Nübling C.M. (2006) Hepatitis B Virus Genotype G Mono-infection and Its Transmission by Blood Components. *Hepatology* 44: 99-107
- [111] Stephan C., Berger A., Carlebach A., Lutz T., Bickel M., Klauke S., Staszewski S., Stuermer M. (2005) Impact of tenofovir-containing antiretroviral therapy on chronic hepatitis B in a cohort co-infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1087–1093
- [112] Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. (2002) Sequence analysis of pre-S/surface and pre-core/core promoter genes of hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with occult HBV infection. *Journal of Medical Virology* 68/2: 216-220
- [113] Chaudhuri V., Tayal R., Nayak B., Acharya S.K., Panda S.K. (2004) Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 127/5: 1356-1371
- [114] Bruss V., Ganem D. (1991) Mutational Analysis of Hepatitis B Surface Antigen Particle Assembly and Secretion. *Journal of Virology* 65/7: 3813-3820
- [115] Stuyver L.J., Locarnini S.A., Lok A., Richman D.D., Carman W.F., Dienstag J.L., Schinazi R.F., HEP DART Int. Committee. (2001) Nomenclature for Antiviral-Resistant Human Hepatitis B Virus Mutations in the Polymerase Region. *Hepatology* 33: 751-757
- [116] Warner N., Locarnini S., Kuiper M., Bartholomeusz A., Ayres A., Yuen L., Shaw T. (2007) The rtL80I Substitution in the Hepatitis B Virus Polymerase is Associated with Lamivudine Resistance and Enhanced Viral Replication in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, epub ahead of press
- [117] Ngui S.L., Hallet R., Teo C.G. (1999) Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Reviews in Medical Virology*. 9/3: 183-209



- [118] Lemey P., Rambaut A., Pybus O.G. (2006) HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Reviews* 8/3: 125-140
- [119] Wong J.K., Hezareh M., Günthard H.F., Havlir D.V., Ignacio C.C., Spina C.A., Richman D.D. (1997) Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 278/5341: 1291-1295
- [120] Pariente N., Pernas M., de la Rosa R., Gómez-Mariano G., Fernández G., Rubio A., López M., Benito J.M., López-Galíndez C., Leal M., Domingo E., Martínez M.A., Mas A. (2004) Long-term suppression of plasma viremia with highly active antiretroviral therapy despite virus evolution and very limited selection of drug-resistant genotypes. *Journal of Medical Virology* 73/3: 350 - 36
- [121] Crandall K.A., Kelsey C.R., Imamichi H., Lane H.C., Salzman N.P. (1999) Parallel Evolution of Drug Resistance in HIV: Failure of Nonsynonymous/Synonymous Substitution Rate Ratio to Detect Selection. *Molecular Biology and Evolution* 16/3: 372-382
- [122] Zhu Y., Curtis M., snow-Lampart A., Yang H., Delaney W., Miller M.D., Borroto-Esoda K. (2007) In vitro drug susceptibility analysis of HBV clinical quasispecies population. *Clinical Microbiology*; epub ahead of print on August 8th
- [123] Shaw T., Bowden S., Locarnini S. (2002) Chemotherapy for Hepatitis B: New Treatment Options. Necessitate Reappraisal of Traditional Endpoints. *Gastroenterology* 123/6: 2135-2140
- [124] Mailliard M. E., Gollan J. L. (2003) Suppressing Hepatitis B without Resistance - So Far, So Good. *The New England Journal of Medicine*. 348/9: 848-850
- [125] Qi X., Xiong S., Yang H., Miller M., Delaney W.E.IV. (2007). In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antiviral Therapy* 12/3: 355-362
- [126] Gerolami R., Bourliere M., Colson P., Halfon P., Borentain P., Henry M., Botta D., Thibault V., Khiri H., Tamalet C. (2007). Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases. *Antiviral Therapy* 11/8: 1103-1106
- [127] Yang H, Qi X, Sabogal A, Miller M, Xiong S, Delaney WE 4th. (2005) Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. *Antiviral therapy* 10/5: 625-633
- [128] Tenney D.J., Levine S.M., Rose R.E., Walsh A.W., Weinheimer S.P., Discotto L., Plym M., Pokornowski K., Yu K.C.F., Angus P., Ayres A., Bartholomeusz A., Sievert W., Thompson G., Warner N., Locarnini S., Colonno R.J.(2004) Clinical Emergence of Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Requires Additional Substitutions in Virus Already Resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 48/9: 3498-3507
- [129] Ngui S.L., Hallet R., Teo C.G. (1999) Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Reviews in Medical Virology* 9/3: 183-209
- [130] Warner N., Locarnini S., Kuiper M., Bartholomeusz A., Ayres A., Yuen L., Shaw T. (2007) The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51/7: 2285-2292

- [131] Torresi J. (2002) The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 97-106
- [132] Torresi J., Earnest-Silveira L., Deliyannis G., Edgtton K., Zhuang H., Locarnini S.A., Fyfe J., Sozzi T., Jackson D.C. (2002) Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 15/293: 305-313
- [133] Tabor E. (2006) Infections by hepatitis B surface antigen gene mutants in Europe and North America. *Journal of Medical Virology* 78 Suppl. 1: 43-47
- [134] Dai C.Y., Chuang W.L., Hsieh M.Y., Lee L.P., Huang J.F., Hou N.J., Lin Z.Y., Chen S.C., Hsieh M.Y., Wang L.Y., Tsai J.F., Chang W.Y., Yu M.L. (2007) Adefovir dipivoxil treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antiviral research* 75/2: 146-151.
- [135] Chang T.T., Lai C.L. Comment on: Hepatitis B virus with primary resistance to adefovir (2006). *New England Journal of Medicine* 355/3: 322-323; author reply 323.
- [136] Fung S.K., Chae H.B., Fontana R.J., Conjeevaram H., Marrero J., Oberhelman K., Hussain M., Lok A.S. (2006) Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 44: 283-290
- [137] Ghany M., Liang T.J. (2007) Drug Targets and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 132; 1574-1585
- [138] Yang H., Westland C.E., Delaney W.E. IV, Heathcote E.J., Ho V., Fry J., Brosgart C., Gibbs C.S., Miller M.D., Xiong S. (2002) Resistance Surveillance in Chronic Hepatitis B Patients Treated With Adefovir Dipivoxil for Up to 60 Weeks. *Hepatology* 36; 464-473
- [139] Yang H., Westland C., Xiong S., Delaney W.E. IV (2004) In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector. *Antiviral Research*, 61/1, January; 27-36
- [140] Fikkert V., Hombrouck A., Van Remoortel B., De Maeyer M., Pannecouque C., De Clercq E., Debyser Z., Witvrouw M. (2004) Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. *AIDS* 18/15: 2019-2028
- [141] Kantor R., Fessel W.J., Zolopa A.R., Israelski D., Shulman N., Montoya J.G., Harbour M., Schapiro J.M., Shafer R.W. (2002) Evolution of Primary Protease Inhibitor Resistance Mutations during Protease Inhibitor Salvage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46/4; 1086-1092
- [142] Kazim S.N., Chauhan R., Das B.C., Sarin S.K. (2006) Association of core promoter mutations with viral breakthrough in chronic hepatitis B patients on long-term lamivudine therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21/10; 1525-1532

- [143] Marrone A., Zampino R., Karayannis P., Cirillo G., Cesaro G., Guerrera B., Ricciotti R., del Giudice F.M., Utili R., Adinolfi L.E., Ruggiero G. (2005) Clinical reactivation during lamivudine treatment correlates with mutations in the precore/core promoter and polymerase regions of hepatitis B virus in patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 22/8; 707-714.
- [144] Wang Y., Wie L., Jiang D., Cong X., Fei R., Chen H., Xiao J., Wang Y. (2005) In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation. *World Journal of Gastroenterology*. 11/5; 649-655
- [145] Wang Y., Wie L., Jiang D., Cong X., Fei R., Chen H., Xiao J., Wang Y. (2007) In vitro resistance to interferon-alpha of hepatitis B virus with basic core promoter double mutation *Antiviral Research* 75/2; 139-145
- [146] Cihlář T., Rosenberg I., Votruba I., Holy A. (1995) Transport of 9-(2-Phosphonomethoxyethyl) Adenine across Plasma Membrane of HeLa S3 Cells Is Protein Mediated. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 39/1; 117-124
- [147] Tsuneyoshi K., Haraguchi M., Hongye Z., Gotanda T., Tachiwada T., Sumizawa T., Furukawa T., Baba M., Akiyama S., Nakagawa M. (2006) Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Letters* 244/2: 239-246
- [148] Ray A.S., Vela J.E., Olson L., Fridland A. (2004) Effective metabolism and long intracellular half life of the anti-Hepatitis B agent adefovir in hepatic cells. *Biochemical Pharmacology* 68; 1825–1831
- [149] Borst P., de Wolf C., van de Wetering K. (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 453; 661-673
- [150] Wielinga P.R., van der Heijden I., Reid G., Beijnen J.H., Wijnholds J., Borst P. (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278/ 20; 17664-17671
- [151] Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D., Paibir S.G., Flynn P.M., Srinivas R.V., Kumar A., Fridland A. (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine* 5/9; 1048-1051
- [152] Wang X., Furukawa T., Nitanda T., Okamoto M., Sugimoto Y., Akiyama S.-I., Baba M. (2003) Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Induces Cellular Resistance to HIV-1 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Molecular Pharmacology* 63/1; 65-72
- [153] AchemAsia 2007 announcement: China's biotechnology industry on the upswing. (2007) *Biotechnology journal* 2/3: 288-290
- [154] Frew S.E., Sammut S.M., Shore A.F., Ramjist J.K., Al-Bader S., Rezaie R., Daar A.S., Singer P.A. (2008) Chinese health biotech and the billion-patient market. *Nature Biotechnology* 26: 37-53
- [155] Sheldon J., Soriano V. (2008) Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Jan 24 (epub ahead of print)

- [156] Loomba R., Liang T.J. (2007) Treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral therapy* 12/sup 3: 33-41
- [157] De Clercq E., Holý A. (2005) Acyclic nucleoside phosphonates : a key class of antiviral drugs. *Nature reviews: Drug discovery* 4 /11: 928-940
- [158] Chen M.T., Billaud J.N., Ilberg M.S., Guidotti L.G., Chisari F.V., Jones J., Hughes J., Milich D.R. (2004) A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 101/ 41; 14913–14918
- [159] Cornberg M., Protzer U., Dollinger M.M., Petersen J., Wedemeyer H., Berg T., Jilg W., Erhardt A., Wirth S., Schirmacher P., Fleig W.E., Manns M.P. (2007) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virus-(HBV-)Infektion. „Upgrade“ der Leitlinie, AWMF-Register-Nr.: 021/011

## ALPHABETISCHES LITERATURVERZEICHNIS, nach Erstautoren

---

- AchemAsia 2007 announcement: China's biotechnology industry on the upswing. (2007) *Biotechnology journal* 2/3: 288-290
- Adefovir Therapy Reduces Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Levels in Chronic HBV Patients. (2004) Internet Conference Report, Digestive Disease Week, May 2004; New Orleans, Louisiana
- Alexander G.J., Brahm J., Fagan E.A., Smith H.M., Daniels H.M., Eddleston A.L., Williams R. (1987) Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 2/8550: 66-69.
- Angus P, Vaughan R., Xiong S., Yang H., Delaney W., Gibbs C., Brosgart C., Colledge D., Edwards R., Ayres A., Bartholomeusz A., Locarnini S. (2003) Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 125/2: 292-297
- Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. (2002) Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology* 83: 2059-2073
- Arguin P.M., Kozarsky P.E., Navin A.W. (eds)/ Centers for Disease Control and Prevention (2005) Prevention of Specific Infectious Diseases: Hepatitis, viral, Type B. In: Health Information for International Travel 2005-2006. US Department of Health and Human Services, Public Health Service
- Bartholomeusz A, Yuen L, Ayres A, Locarnini S. (2006) SeqHepB: a sequence analysis program and relational database system for hepatitis B virus mutations in HBV and HIV-HBV coinfecting patients. Abstracts of the XV International Drug Resistance Workshop; June 13-17, 2006; Sitges, Spain. Abstract 6.
- Bartholomeusz A., Locarnini S. (2006) Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *Journal of Medical Virology* 78: 52-55
- Bartholomeusz A., Tehan B.G., Chalmers D.K. (2004) Comparisons of the HBV and HIV polymerase and antiviral resistance mutations. *Antiviral therapy* 9/2: 149-160
- Benhamou Y, Thibault V, Vig P, Calvez V, Marcelin AG, Fievet MH, Currie G, Chang CG, Biao L, Xiong S, Brosgart C, Poynard T. (2006) Safety and efficiency of adefovir dipivoxil in patients infected with lamivudine-resistant hepatitis B and HIV-1. *Journal of Hepatology* 44/1: 62-67.
- Blanchard A., Ferris S., Chamaret S., Guétard D., Montagnier L. (1998) Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. *Journal of Virology* 72/5: 4537-4540
- Borst P., de Wolf C., van de Wetering K. (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 453: 661-673
- Bouchard M.J., Schneider R.J. (2004) The Enigmatic X Gene of Hepatitis B Virus. *Journal of Virology* 78/23: 12725-12734
- Bowyer S.M., Sim J.G. (2000) Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *Journal of General Virology* 81/2: 379-392
- Brunelle M.-N., Jacquard A.-C., Pichoud C., Durantel D., Carrouée-Durantel S., Villeneuve J.-P., Trépo C., Zoulim F. (2005) Susceptibility to Antivirals of a Human HBV Strain With Mutations Conferring Resistance to Both Lamivudine and Adefovir. *Hepatology* 41:1391-1398
- Brunetto M.R., Rodriguez U.A., Bonino F. (1999) Hepatitis B Virus Mutants. *Intervirology* 42/2-3: 69-80
- Bruss V., Ganem D. (1991) Mutational Analysis of Hepatitis B Surface Antigen Particle Assembly and Secretion. *Journal of Virology* 65/7: 3813-3820
- Burda M.R., Günther S., Dandri M., Will H., Petersen J. (2001) Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Research* 52: 125-138

- Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J., Makris A., Thomas H.C. (1989) Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2/8663: 588-591
- Chang J.J., Lewin S.R. (2007) Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Immunology and Cell Biology* 85/1, 16-23
- Chang T.T., Lai C.L. Comment on: Hepatitis B virus with primary resistance to adefovir (2006). *New England Journal of Medicine* 355/3: 322-323; author reply 323.
- Chaudhuri V., Tayal R., Nayak B., Acharya S.K., Panda S.K. (2004) Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 127/5: 1356-1371
- Chayama K., Suzuki Y., Kobayashi Ma., Kobayashi Mi., Tsubota A., Hashimoto M., Miyano Y., Koike H., Kobayashi Mar., Koida I., Arase Y., Saitoh S., Murashima N., Ikeda K., Kumada H (1998) Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 27/6: 1711-1716
- Chen M.T., Billaud J.N., Ilberg M.S., Guidotti L.G., Chisari F.V., Jones J., Hughes J., Milich D.R. (2004) A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 101/ 41; 14913–14918
- Chen Y.C., Delbrook K., Dealwis C., Mimms L., Mushahwar I.K., Mandecki W. (1996) Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93:1997-2001.
- Chin R., Locarnini S. (2003) Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Reviews in Medical Virology* 13: 255-272
- Chisari F., Ferrari C. (1995) Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology* 13: 29-60
- Chudy M., Schmidt M., Czudai V., Scheiblaue H., Nick S., Mosebach M., Hourfar M.K., Seifried E., Roth W.K., Grünelt E., Nübling C.M. (2006) Hepatitis B Virus Genotype G Mono-infection and Its Transmission by Blood Components. *Hepatology* 44: 99-107
- Cihlář T., Rosenberg I., Votruba I., Holy A. (1995) Transport of 9-(2-Phosphonomethoxyethyl) Adenine across Plasma Membrane of HeLa S3 Cells Is Protein Mediated. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 39/1; 117-124
- Connor R.I., Sheridan K.F., Ceradini D., Choe S., Landau N.R. (1997) Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1-Infected Individuals. *The Journal of Experimental Medicine* 185/4: 621-628
- Cooksley W. G. E., Piratvisuth T., Lee S.-D., Mahachai V., Chao Y.-C., Tanwandee T., Chutaputti A., Yu Chang W., Zahm F. E., Pluck N. (2003) Peginterferon  $\alpha$ -2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis* 10/4: 298-305
- Cornberg M., Protzer U., Dollinger M.M., Petersen J., Wedemeyer H., Berg T., Jilg W., Erhardt A., Wirth S., Schirmacher P., Fleig W.E., Manns M.P. (2007) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virus-(HBV-)Infektion. „Upgrade“ der Leitlinie, AWMF-Register-Nr.: 021/011
- Crandal K.A., Kelsey C.R., Imamich H., Lane H.C., Salzman N.P. (1999) Parallel Evolution of Drug Resistance in HIV: Failure of Nonsynonymous/Synonymous Substitution Rate Ratio to Detect Selection. *Molecular Biology and Evolution* 16/3: 372-382
- Crandall K.A., Kelsey C.R., Imamichi H., Lane H.C., Salzman N.P. (1999) Parallel Evolution of Drug Resistance in HIV: Failure of Nonsynonymous/Synonymous Substitution Rate Ratio to Detect Selection. *Molecular Biology and Evolution* 16/3: 372-382

- Dai C.Y., Chuang W.L., Hsieh M.Y., Lee L.P., Huang J.F., Hou N.J., Lin Z.Y., Chen S.C., Hsieh M.Y., Wang L.Y., Tsai J.F., Chang W.Y., Yu M.L. (2007) Adefovir dipivoxil treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antiviral research* 75/2: 146-151.
- Dando T., Plosker G. (2003) Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 63/20: 2215-2234.
- Das K., Xiong X., Yang H., Westland C.E., Gibbs C.S., Sarafianos S.G., Arnold E. (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: 4771-4779
- De Clercq E. (2003) Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 16/4: 569-596
- De Clercq E., Holý A. (2005) Acyclic nucleoside phosphonates : a key class of antiviral drugs. *Nature reviews: Drug discovery* 4 /11: 928-940
- Delaney IV. W.E., Yang H., Miller M.D., Gibbs C.S., Xiong S. (2004) Combinations of Adefovir with Nucleoside Analogs Produce Additive Antiviral Effects against Hepatitis B Virus in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48/10: 3702-3710
- Delaney W.E., Yang H., Westland C.E., Das K., Arnold E., Gibbs C.S., Miller M.D., Xiong S. (2003) The Hepatitis B Virus Polymerase mutation rtV173L is selected during Lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *Journal of Virology* 77/21: 11833-11841
- Delmas J., Schorr O., Jamard C., Gibbs C., Trépo C., Hantz O., Zoulim F. (2002) Inhibitory Effect of Adefovir on Viral DNA Synthesis and Covalently Closed Circular DNA Formation in Duck Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes In Vivo and In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46/2: 425-433
- Dienstag J.L., Perrillo R.P., Schiff E.R., Bartholomew M., Vicary C., Rubin M. (1995) A Preliminary Trial of Lamivudine for Chronic Hepatitis B Infection. *New England Journal of Medicine* 333/25: 1657-1661
- Fikkert V., Hombrouck A., Van Remoortel B., De Maeyer M., Pannecouque C., De Clercq E., Debyser Z., Witvrouw M. (2004) Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. *AIDS* 18/15: 2019-2028
- Frew S.E., Sammut S.M., Shore A.F., Ramjani J.K., Al-Bader S., Rezaie R., Daar A.S., Singer P.A. (2008) Chinese health biotech and the billion-patient market. *Nature Biotechnology* 26: 37-53
- Fung S.K., Chae H.B., Fontana R.J., Conjeevaram H., Marrero J., Oberhelman K., Hussain M., Lok A.S. (2006) Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 44: 283-290
- Fung S.K., Lok A.S.F. (2004) Drug Insight: nucleoside and nucleotide analog inhibitors for hepatitis B. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 1: 90-97
- Funk A., Mhamdi M., Lin L., Will H., Sirma H. (2004) Itinerary of Hepatitis B Viruses: Delineation of Restriction Points Critical for Infectious Entry. *Journal of Virology* 78/15: 8289-8300
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P. (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281/5733: 646-650
- Ganeshan S., Dickover R.E., Korber B.T.M., Bryson Y.J., Wolinsky S.M. (1997) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Evolution in Children with Different Rates of Development of Disease. *Journal of Virology* 71/1: 663-677
- Gerolami R., Bourliere M., Colson P., Halfon P., Borentain P., Henry M., Botta D., Thibault V., Khiri H., Tamalet C. (2007). Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases. *Antiviral Therapy* 11/8: 1103-1106

- Ghany M., Liang T.J. (2007) Drug Targets and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 132; 1574-1585
- Gilead Science: (2006) HEPSERA® (Adefovir dipivoxil). Produktinformation.
- Günther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H. (1999) Naturally occurring hepatitis B virus variants. *Advances in Virus Research* 52: 25-105
- Günther S., Li B-C., Miska S., Krüger D.H., Meisel H., Will H. (1995) A Novel Method for Efficient Amplification of Whole Hepatitis B Virus Genomes Permits Rapid Functional Analysis and Reveals Deletion Mutants in Immunosuppressed Patients. *Journal of Virology* 69/9: 5437-5444
- Hadziyannis S., Bramou T., Makrid A., Moussoulis G., Zignego L., Papaioannou C. (1990) Interferon alfa-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic active hepatitis type B. *Journal of Hepatology* 11/1: 133-136
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Brosgart CL, Borroto-Esoda K, Arterburn S, Chuck SL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. (2006) Long-Term Therapy With Adefovir Dipivoxil for HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B for up to 5 Years. *Gastroenterology* 20 (epub ahead of print)
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. (2005) Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 352/26: 2673-2681.
- Hannoun C., Horal P., Lindh P. (2000) Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *Journal of General Virology* 81: 75-83
- Heintges T., Häussinger D. (2006) Hepatitis B. *Infektion – Therapie – Prophylaxe*. Thieme Verlag; Kapitel 4
- Hunt C.M., McGill J.M., Allen M.I., Condreay L.D. (2000) Clinical relevance of Hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 31/5: 1037-1044
- Juel-Jensen B. E., MacCallum F.O. (1964) Treatment of Herpes Simplex Lesions of the Face with Idoxuridine: Results of a Double-blind Controlled Trial. *British Medical Journal* 2/5415: 987–988.
- Kantor R., Fessel W.J., Zolopa A.R., Israelski D., Shulman N., Montoya J.G., Harbour M., Schapiro J.M., Shafer R.W. (2002) Evolution of Primary Protease Inhibitor Resistance Mutations during Protease Inhibitor Salvage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46/4; 1086–1092
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. (2000) Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118/3: 554-559
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. (2002) Sequence analysis of pre-S/surface and pre-core/core promoter genes of hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with occult HBV infection. *Journal of Medical Virology* 68/2: 216-220
- Karayiannis P. (2003) Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 761-785
- Kazim S.N., Chauhan R., Das B.C., Sarin S.K. (2006) Association of core promoter mutations with viral breakthrough in chronic hepatitis B patients on long-term lamivudine therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21/10; 1525-1532
- Kekulé A.S., Lauer U., Weiss L., Luber B., Hofschneider P.H. (1993) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 361/6414: 742-745
- Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd A. H. (2002) Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology* 83: 1267-1280
- Kolber M.A. (2007) Development of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy: does competitive advantage drive evolution. *AIDS Reviews* 9/2: 68-74



- Lacombe K., Ollivet A., Gozlan J., Durantel S., Tran N., Girard P-M, Zoulim F. (2006) A novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir but not to tenofovir in an HIV-hepatitis B virus-co-infected patient. *AIDS* 20/17: 2229-2231
- Lai C-L., Chien R.-N., Leung N.W.Y., Chang T.-T., Guan R., Tai D.-I., Ng K.-Y., Wu P.-C., Dent J.C., Barber J., Stephenson S.L., Gray D.F. for The Asia Hepatitis Lamivudine Study Group (1998) A One-Year Trial of Lamivudine for Chronic Hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 339/2: 61-68
- Lampertico P., Del Ninno E., Manzin A., Donato M.F., Rumi M.G., Lunghi G., Morabito A., Clementi M., Colombo M. (2003) A randomized, controlled trial of a 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum. *Hepatology* 26/6: 1621-1625
- Le Bouvier G.L., McCollum R.W., Hierholzer W.J., Irwin G.R., Krugman S., Giles J.P. (1972) Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *Journal of the American Medical Association* 222/8: 928-930
- Lee YS, Suh DJ, Lim YS, Jung SW, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Yoo W, Kim SO. (2006) Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 43/6: 1385-1391.
- Leitner T., Escanilla D., Franzen C., Uhlen M., Albert M. (1996) Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10864-10869
- Lemey P., Rambaut A., Pybus O.G. (2006) HIV evolutionary dynamics within and among hosts. *AIDS Reviews* 8/3: 125-140
- Leung N. (2002) Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *Journal of Gastroenterol Hepatology* 17/4: 409-14
- Liu S.-L., Schacker T., Musey L., Shriner D., McElrath M.J., Corey L., Mullins J.I. (1997) Divergent Patterns of Progression to AIDS after Infection from the same Source: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution and Antiviral Responses. *Journal of Virology* 71/6: 4284-4295
- Locarnini S. (2005) Molecular Virology and the Development of Resistant Mutants: Implications for therapy. *Seminar in Liver Disease* 25: 9-19
- Locarnini S., Mason W.S., (2006) Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *Journal of Hepatology* 44: 422-431
- Löffler G. (2001) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, 4.Auflage, Kap.11.1
- Lok A.S., Akarca U.S., Greene S. (1995) Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology*. 21/1: 19-24.
- Loomba R., Liang T.J. (2007) Treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral therapy* 12/sup 3: 33-41
- Mailliard M. E., Gollan J. L. (2003) Suppressing Hepatitis B without Resistance - So Far, So Good. *The New England Journal of Medicine*. 348/9: 848-850
- Manesis E.K., Hadziyannis E.S., Angelopoulou O.P., Hadziyannis S.J. (2007) Prediction of treatment-related HbsAg loss in HbeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HbsAg levels. *Antiviral Therapy* 12/1: 73-82
- Marcellin P., Chang T.T., Lim S.G., Tong M.J., Sievert W., Shiffman M.L., Jeffers L., Goodman Z., Wulfsohn M.S., Xiong S., Fry J., Brosgart C.L.; Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. (2003) Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 348/9: 808-816
- Marrone A., Zampino R., Karayannis P., Cirillo G., Cesaro G., Guerrera B., Ricciotti R., del Giudice F.M., Utili R., Adinolfi L.E., Ruggiero G. (2005) Clinical reactivation during lamivudine treatment correlates with mutations in the precore/core promoter and polymerase regions of hepatitis B virus in patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 22/8; 707-714.

- Melegari M., Scaglioni P.P., Wands J.R. (1998) Hepatitis B Virus mutants associated with 3TC and Famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27: 628-633
- Metzker M.L., Mindell D.P., Liu X-M., Ptak R.G., Gibbs R.A., Hillis D.M. (2002) Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99/22: 14292-14297
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting M. (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8.Auflage, Kap. 6.7.1: 656-657
- Nei M., Gojobori T. (1986) Simple Methods for Estimating the Numbers of Synonymous and Nonsynonymous Nucleotide Substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3/5: 418-426
- Neue Impfpfehlungen der STIKO am Robert-Koch-Institut (Juli 2004)
- Ngui S.L., Hallet R., Teo C.G. (1999) Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Reviews in Medical Virology*. 9/3: 183-209
- Ngui S.L., Hallet R., Teo C.G. (1999) Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Reviews in Medical Virology* 9/3: 183-209
- Norder H., Couroucé A-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S-D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. (2004) Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBsAg Subtypes. *Intervirology* 47: 289-309
- Nowak M.A., Bonhöffer S, Hill A.M., Böhme R., Thomas H.C., McDade H. (1996) Viral Dynamics in Hepatitis B Virus Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 4398-4402
- Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. (1988) Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *Journal of General Virology* 69: 2575-2583
- Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Sugino, Y., Nishioka, K. (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Research* 11/6: 1747-1757
- Ono-Nita S.K., Kato N., Shiratori Y., Masaki T., Lan K.-H., Carrilho F.J., Omata M. (1999) YMDD Motif in Hepatitis B Virus DNA polymerase influences on replication and Lamivudin resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 29: 939-945
- Osiowy C., Giles E., Tanaka Y., Mizokami M., Minuk G.Y. (2006) Molecular Evolution of Hepatitis B Virus over 25 Years. *Journal of Virology* 80/21: 10307-10314
- Pariente N., Pernas M., de la Rosa R., Gómez-Mariano G., Fernández G., Rubio A., López M., Benito J.M., López-Galíndez C., Leal M., Domingo E., Martínez M.A., Mas A. (2004) Long-term suppression of plasma viremia with highly active antiretroviral therapy despite virus evolution and very limited selection of drug-resistant genotypes. *Journal of Medical Virology* 73/3: 350 - 36
- Park S.G., Kim Y., Park E., Ryu H.M., Jung G. (2003) Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *European Journal of Biochemistry* 270: 2929–2936
- Peters M.G., Hann H.W., Martin P., Heathcote E.J., Buggisch P., Rubin R., Bourliere M., Kowdley K., Trepo C., Gray D.F., Sullivan M., Kleber K., Ebrahimi R., Xiong S., Brosgart C.L. (2004) Adefovir dipivoxil alone or in combination with Lamivudine in patients with Lamivudine-resistant chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 126/1: 91-101
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* 8/12: 3867-3874
- Protzer U., Nassal M., Chiang P.-W., Kirschfink M., Schaller H. (1999) Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96/19: 10818-10823

- Qaqish R.B., Mattes K.A., Ritchie D.J. (2003) Adefovir dipivoxil: A new antiviral agent for the treatment of Hepatitis B Virus infection. *Clinical Therapeutics* 25 no. 12: 3084-3099
- Qi X., Xiong S., Yang H., Miller M., Delaney W.E.IV. (2007). In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antiviral Therapy* 12/3: 355-362
- Radziwill G., Tucker W., Schaller H. (1990) Mutational Analysis of the Hepatitis B Virus P Gene Product: Domain Structure and RNase H Activity. *Journal of Virology* 64/2: 613-620
- Ray A.S., Vela J.E., Olson L., Fridland A. (2004) Effective metabolism and long intracellular half life of the anti-Hepatitis B agent adefovir in hepatic cells. *Biochemical Pharmacology* 68; 1825–1831
- Realdi G., Fattovich G., Pastore G., Caredda F., Noventa F., Santantonio T., Moroni M., Criscuolo D., Maladorno D., Rugge M. (1990) Problems in the management of chronic hepatitis B with interferon: experience in a randomized, multicentre study. *Journal of Hepatology* 11/1: 129-132
- Reid G., Wielinga P., Zelcer N., De Haas M., Van Deemter L., Wijnholds J., Balzarini J., Borst P. (2003) Characterization of the Transport of Nucleosid Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology* 63: 1094-1103
- Renz-Polsterer H., Krautzig S., Braun J. (2004) *Basislehrbuch Innere Medizin, Kapitel 7.5.3*
- Roggendorf M., Roß S. (2004) Definition und Diagnostik der akuten und chronischen Hepatitis B. 679-681;  
 Niederau C. (2004) Indikationsstellung zur Therapie der chronischen Hepatitis B und D 682-686;  
 Manns M.P., Caselmann W.H., Wiedmann K.H., Wedemeyer H. (2004) Standardtherapie der chronischen Hepatitis B.  
 Aus: Diagnostik, Verlauf und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten in Zusammenarbeit mit dem Kompetenznetz Hepatitis. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 42/8: 677-730
- Schildgen O., Fiedler M., Dahmen U., Li J., Lohregel B., Lu M., Roggendorf M. (2006) Fluctuation of the cytokine expression in the liver during the chronic woodchuck hepatitis virus (WHV) infection is not related to viral load. *Immunology Letters* 102/1: 31-37
- Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D., Paibir S.G., Flynn P.M., Srinivas R.V., Kumar A., Fridland A. (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine* 5/9; 1048-1051
- Seeger C., Mason W.S. (2000) Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64/1: 51-68
- Shaw T., Bowden S., Locarnini S. (2002) Chemotherapy for Hepatitis B: New Treatment Options. Necessitate Reappraisal of Traditional Endpoints. *Gastroenterology* 123/6: 2135-2140
- Sheldon J., Rodès B., Zoulim F., Bartholomeusz A., Soriano V. (2006) Mutations Affecting the Replication Capacity of the Hepatitis B Virus. *Journal of Viral Hepatitis* 13/7: 427-434
- Sheldon J., Soriano V. (2008) Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Jan 24 (epub ahead of print)
- Shepard C.W., Simard E.P., Finelli L., Fiore A.E., Bell B.P. (2006) Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiologic Reviews* 28: 112-125
- Stauber R. (2004) Therapie der chronischen Hepatitis B. *J. Gastroenterol. Hepatol. Erkr.* 2: 12-15

- Stephan C., Berger A., Carlebach A., Lutz T., Bickel M., Klauke S., Staszewski S., Stuermer M. (2005) Impact of tenofovir-containing antiretroviral therapy on chronic hepatitis B in a cohort co-infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1087–1093
- Stuyver L.J., Locarnini S.A., Lok A., Richman D.D., Carman W.F., Dienstag J.L., Schinazi R.F., HEP DART Int. Committee. (2001) Nomenclature for Antiviral-Resistant Human Hepatitis B Virus Mutations in the Polymerase Region. *Hepatology* 33: 751-757
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R. (2000) A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 81/1: 67-74
- Su J.M., Lai X.M., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Yen S.H., Chang F.Y., Lee S.D., Lee W.P. (2007) X protein of hepatitis B virus functions as a transcriptional corepressor on the human telomerase promoter. *Hepatology* 46/2: 402-413
- Sugauchi F., Chutaputti A., Orito E., Kato H., Suzuki S., Ueda R., Mizokami M. (2002) Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17/6: 671-676
- Tabor E. (2006) Infections by hepatitis B surface antigen gene mutants in Europe and North America. *Journal of Medical Virology* 78 Suppl. 1: 43-47
- Tang H., Oishi N., Kaneko S., Murakami S. (2006) Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Science* 97/10: 977-983
- Tenney D.J., Levine S.M., Rose R.E., Walsh A.W., Weinheimer S.P., Discotto L., Plym M., Pokornowski K., Yu K.C.F., Angus P., Ayres A., Bartholomeusz A., Sievert W., Thompson G., Warner N., Locarnini S., Colonno R.J. (2004) Clinical Emergence of Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Requires Additional Substitutions in Virus Already Resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 48/9: 3498-3507
- Tong S.P., Brotman B., Li J.S., Vitvitski L., Pascal D., Prince A.M., Trépo C. (1991) In vitro and in vivo replication capacity of the precore region defective hepatitis B virus variants. *Journal of Hepatology* 13/4: 68-73
- Torresi J. (2002) The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of Hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 97-106
- Torresi J. (2002) The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 97-106
- Torresi J., Earnest-Silveira L., Deliyannis G., Edgton K., Zhuang H., Locarnini S.A., Fyfe J., Sozzi T., Jackson D.C. (2002) Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 15/293: 305-313
- Tsuneyoshi K., Haraguchi M., Hongye Z., Gotanda T., Tachiwada T., Sumizawa T., Furukawa T., Baba M., Akiyama S., Nakagawa M. (2006) Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Letters* 244/2: 239-246
- van Zonneveld M., Honkoop P., Hansen B.E., Niesters H.G.M., Murad S.D., de Man R.A., Schalm S.W., Janssen H.L.A. (2004) Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 39/3: 804-810
- Wang X., Furukawa T., Nitanda T., Okamoto M., Sugimoto Y., Akiyama S.-I., Baba M. (2003) Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Induces Cellular Resistance to HIV-1 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Molecular Pharmacology* 63/1; 65-72
- Wang Y., Wie L., Jiang D., Cong X., Fei R., Chen H., Xiao J., Wang Y. (2005) In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation. *World Journal of Gastroenterology*. 11/5; 649-655

- Wang Y., Wie L., Jiang D., Cong X., Fei R., Chen H., Xiao J., Wang Y. (2007) In vitro resistance to interferon-alpha of hepatitis B virus with basic core promoter double mutation *Antiviral Research* 75/2; 139-145
- Warner N., Locarnini S., Kuiper M., Bartholomeusz A., Ayres A., Yuen L., Shaw T. (2007) The rtL80I Substitution in the Hepatitis B Virus Polymerase is Associated with Lamivudine Resistance and Enhanced Viral Replication in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, epub ahead of press
- Warner N., Locarnini S., Kuiper M., Bartholomeusz A., Ayres A., Yuen L., Shaw T. (2007) The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51/7: 2285-2292
- Westland C., Delaney W. IV, Yang H., Chen S.-S., Marcellin P., Hadziyannis S., Gish R., Fry J., Brosgart C., Gibbs C., Miller M., Xiong S. (2003) Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 125/1: 107-116
- Westland C.E., Yang H., Delaney IV W.E., Gibbs C.S., Miller M.D., Wulfsohn M., Fry J., Brosgart C.L., Xiong S. for the 437 and 438 Study Teams. (2003) Week 48 Resistance Surveillance in Two Phase 3 Clinical Studies of Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 38: 96-103
- Whalley S.A., Brown D., Webster G.J.M., Jacobs R., Reignat S., Bertoletti A., Teo C.-G., Emery V., Dusheiko G.M. (2004) Evolution of hepatitis B virus during primary infection in humans: Transient generation of cytotoxic T-cell mutants. *Gastroenterology* 127/4: 1131-1138
- Wielinga P.R., van der Heijden I., Reid G., Beijnen J.H., Wijnholds J., Borst P. (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278/ 20; 17664-17671
- Wong D.K., Yuen M.F., Ngai V.W., Fung J., Lai C.L. (2006) One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antiviral Therapy* 11/7: 909-916
- Wong J.K., Hezareh M., Günthard H.F., Havlir D.V., Ignacio C.C., Spina C.A., Richman D.D. (1997) Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 278/5341: 1291-1295
- World Health Organization, Fact sheet No.204, October 2000
- Yadav V., Chu C.K. (2004) Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 4313-4317
- Yang H, Qi X, Sabogal A, Miller M, Xiong S, Delaney WE 4th. (2005) Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. *Antiviral therapy* 10/5: 625-633
- Yang H., Westland C., Xiong S., Delaney W.E. IV (2004) In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector. *Antiviral Research*, 61/1, January; 27-36
- Yang H., Westland C.E., Delaney W.E. IV, Heathcote E.J., Ho V., Fry J., Brosgart C., Gibbs C.S., Miller M.D., Xiong S. (2002) Resistance Surveillance in Chronic Hepatitis B Patients Treated With Adefovir Dipivoxil for Up to 60 Weeks. *Hepatology* 36; 464-473
- Yatsuji H., Noguchi C., Hiraga N., Mori N., Tsuge M., Imamura M., Takahashi S., Iwao E., Fujimoto Y., Ochi H., Abe H., Maekawa T., Tateno C., Yoshizato K., Suzuki F., Kumada H., Chayama K. (2006) Emergence of a Novel Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Variant with a Substitution Outside the YMDD Motif. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50/11: 3867-3874
- Yim H.J., Hussain M., Liu Y., Wong S.N., Fung S.K., Lok A.S.F. (2006) Evolution of Multi-Drug Resistant Hepatitis B Virus During Sequential Therapy. *Hepatology* 44: 703-712

- Zhang P., McLachlan A. (1994) Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology* 202/1: 430-440
- Zhang Y.-Y., Summers J. (2000) Low Dynamic State of Viral Competition in a Chronic Avian Hepadnavirus Infection. *Journal of Virology* 74/11: 5257-5265
- Zhu Y., Curtis M., snow-Lampart A., Yang H., Delaney W., Miller M.D., Borroto-Esoda K. (2007) In vitro drug susceptibility analysis of HBV clinical quasispecies population. *Clinical Microbiology*; epub ahead of print on August 8th
- Zöllner B., Petersen J., Puchhammer-Stöckl E., Kletzmayer J., Sterneck M., Fischer L., Schröter M., Laufs R., Feucht H.H. (2004) Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 39/1: 42-50
- Zöllner B., Petersen J., Schröter M., Laufs R., Schoder V., Feucht H.-H. (2001) 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *The Lancet* 357: 934-935

## ANHANG

---

### HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ADF	Adefovir
bp	basepairs, Basenpaare
CFU	colony forming unit, eine Bakterienkolonie
GE	genome equivalent, hier: ein HBV-Genomäquivalent
GFP	green fluorescent protein
ORF	open reading frame, Leserahmen
PCR	polymerase chain reaction
RT	Reverse Transkriptase
TNF	Tenofovir
3TC	Lamivudin

### ANMERKUNGEN

Hepatitis B Viren kommen in zahlreichen Spezies vor. Der Einfachheit halber wurde in dieser Arbeit auf den Zusatz „humanpathogen“ verzichtet, wenn von Hepatitis B Viren die Rede war. Sofern nicht anders vermerkt, waren mit der Bezeichnung „Hepatitis B Viren“ immer humanpathogene Hepatitis B Viren gemeint.

Ebenso wurde aus Gründen der Einfachheit häufig die Bezeichnung „Nukleosidanaloga“ als Überbegriff für Nukleosid- und Nukleotidanaloga verwendet.

## DANKSAGUNG

---

Ich bedanke mich bei all denen, die diese Dissertation möglich gemacht haben:

Bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hans Will, für das Wagnis, eine Medizinstudentin in seine Abteilung aufzunehmen, für die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit und den Willen, alles möglich zu machen.

Bei dem Betreuer meiner Arbeit, PD Dr. Hüseyin Sirma, für das immer-da-sein, für das große Vertrauen und die Loyalität, für die Mühe, den Einsatz und für unzählige interessante Gespräche.

Bei Dr. Anneke Funk, die mir die Laborarbeit vom Pipettieren bis zur Zellkultur beigebracht hat. Danke für die grenzenlose Geduld, die unzähligen täglichen Hilfestellungen, die Motivation und – die Vorbildsfunktion!

Bei Dr. Mouna Mhamdi und Nicole Lohrengel für die tausend kleineren und zehntausend größeren Gefallen, für die Hilfe, für den Beistand in guten und in schlechten Tagen, den Spaß im Labor – und vor allem für die Freundschaft.

Bei Prof. Dr. Hubert Feucht und ganz besonders bei PD Dr. Bernhard Zöllner, meinen Betreuern aus der Mikrobiologie, für die Zusammenarbeit, für die Hilfe bei den klinischen Aspekten meiner Arbeit, für die Solidarität und die häufige Aufmunterung.

Bei PD Dr. Arne Ludwig, ohne den die phylogenetischen Analysen nicht möglich gewesen wären, für die Zeit und die viele Arbeit, für die netten Gespräche und die Bekanntschaft.

Und besonderer Dank all denen, die mir jenseits des Labors beigestanden haben: meinen Eltern für die Begeisterung und den Rückhalt, meinen Geschwistern für den Sarkasmus, meinen Freundinnen für die Solidarität unter Doktorandinnen und die guten Ratschläge, und bei Fabian für das immer-auf-meiner-Seite sein, das Glück und die Liebe.



## **BEREITS VERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE**

---

Schildgen O., Sirma H., Funk A., Olotu C., Wend, U.C., Hartmann, H., Helm, M., Rockstroh J.K., Willems W.R., Will H., Gerlich W.H. (2006) Variant of Hepatitis B Virus with Primary Resistance to Adefovir. New England Journal of Medicine 354/17: 1807-12

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

*Cynthia Olotu*