

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Untersuchung der HBV-Genotypen bei antiviral behandelten
Hepatitis B-Patienten im Zeitraum von 1997 bis 2004 an der
Universitätsklinik Würzburg

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Martin Johannes Juling
aus Aachen

Würzburg, September 2009

Referent: Professor Dr. A. Rethwilm

Korreferent: Professor Dr. H. Klinker

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2010

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Überblick	1
1.2	Das Hepatitis B-Virus.....	1
1.2.1	Struktur und Genom des Hepatitis B-Virus.....	1
1.2.2	Die HBV-Polymerase	3
1.2.3	Virusreplikation	4
1.3	Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis B-Virus.....	5
1.4	Pathogenese und klinischer Verlauf der Hepatitis B-Infektion	6
1.5	Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion.....	7
1.5.1	Interferon alpha.....	8
1.5.2	Nukleosid- und Nukleotidanaloga	8
1.6	HBV-Genotypen	10
1.6.1	Grundlagen der Genotyp-Einteilung.....	10
1.6.2	HBV-Genotypverteilung weltweit.....	11
1.6.3	Klinische Relevanz der HBV-Genotypen.....	12
1.7	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Patientenproben	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	DNA-Extraktion	14
2.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	15
2.2.3	Aufreinigung von positiven PCR-Produkten.....	16
2.2.4	DNA-Sequenzierung.....	17
2.2.5	Auswertung der HBV-Sequenzen.....	18
2.2.6	Genotypisierung.....	18
2.3	Statistische Auswertung.....	19
3	Ergebnisse.....	20
3.1	Demographische Daten des Patientenkollektivs.....	20
3.2	Sequenzierungsergebnisse	21
3.2.1	Phylogenetischer Baum	21
3.2.2	Genotypverteilung	23
3.2.3	Genotyp und Herkunftsland.....	24

3.2.4 Altersverteilung in Abhängigkeit vom Genotyp.....	25
3.2.5 Viruslast in Abhängigkeit vom Genotyp	25
3.2.6 Antivirale Therapie in Abhängigkeit vom Genotyp	26
4 Diskussion	28
5 Zusammenfassung.....	33
6 Literaturverzeichnis	34
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Gamma-GT	Gammaglutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
IFN	Interferon
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
ORF	Open reading frame (= offener Leserahmen)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Reverse Transkriptase
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Überblick

Die Infektion mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) stellt eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit dar. Bei mehr als 2 Mrd. Menschen lässt sich eine aktuelle oder abgelaufene HBV-Infektion nachweisen. Etwa 350 Mio. Menschen sind chronisch infiziert. Die Infektion ist damit eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen, die die chronische Hepatitis, die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) einschließen (Bielawski et al., 2004).

1.2 Das Hepatitis B-Virus

1.2.1 Struktur und Genom des Hepatitis B-Virus

Das HBV ist ein kleines, umhülltes DNA-Virus, das zur Familie der Hepadnaviridae (Genus Orthohepadnaviridae) gezählt wird. Das Virus enthält eine Doppelstrang-DNA, die aus einem kompletten (-)-Strang und einem inkompletten (+)-Strang besteht. Das aus etwa 3200 Basenpaaren bestehende Genom enthält vier offene Leserahmen (ORF, engl.: open reading frame), die teilweise überlappen (Abb. 1).

Das Precore/Core-Gen besteht aus der Precore-Region am 5'-Ende und der Core-Region am 3'-Ende. Es kodiert für das Kapsid-Protein Hepatitis B-Core-Antigen (HBcAg) und das Hepatitis B-e-Antigen (HBeAg). Die HBeAg-Synthese erfolgt durch Translation der Precore- und Core-Region. Wird nur ein Teil des Precore am NH₂-Terminus abgespalten, so entsteht das membranständige HBeAg; erfolgt auch am COOH-Terminus eine Abspaltung, liegt das sezernierte HBeAg vor. Das PreS1-/PreS2-/S-Gen kodiert für drei unterschiedlich große Formen des Hüllproteins. Die häufigste Form ist das 24 kD-S-Protein, das sogenannte HBs-Antigen (HBsAg). Daneben gibt es noch das große PreS1- und das kleine PreS2-HBs-Antigen. Das P-Gen kodiert für die virale Polymerase. Das Gen für die Hüllproteine wird von dem Polymerase-Gen komplett überlappt. Auf den genauen Aufbau der Polymerase wird an späterer Stelle noch eingegangen. Das X-Gen kodiert für das X-Protein, das die

Signaltransduktion der Wirtszelle moduliert und die wirtsspezifische und virale Genexpression beeinflusst. Im HBV-Genom gibt es keine nicht-kodierenden Abschnitte, sodass alle Regulationselemente auch Teil der Protein-kodierenden Sequenz sind (Bielawski et al., 2004; Ganem and Prince, 2004; Torresi, 2002).

Die kompakte Organisation des viralen Genoms in ORFs ist charakteristisch für die Familie der Hepadnaviren. Zudem sind Hepadnaviren die einzigen DNA-Viren, die sich ähnlich den Retroviren einer reversen Transkriptase zur Replikation des Genoms bedienen. Aufgrund des Fehlens einer Proofreading-Aktivität hat die reverse Transkriptase eine hohe Fehlerrate. Dies führt zur Bildung einer HBV-Quasispezies, einem Gemisch von Viren mit verschiedenen Mutationen. Diese Mutationen können nachteilig für das Virus sein, oder auch einen Selektionsvorteil zur Folge haben. Obwohl die meisten Mutationen nicht zu einer signifikanten Funktionsveränderung führen, ist es möglich, dass einige der Mutationen Veränderungen im überlappenden Gen und seines Translationsproduktes verursachen. Das komplette Überlappen des PreS1-/PreS2-/S-Gens mit dem Polymerase-Gen stellt eine Situation dar, in der Mutationen innerhalb des Hüllprotein-Gens eine funktionelle Veränderung der viralen Polymerase bedeuten können. Ebenso können Mutationen der Polymerase, die beispielsweise im Zuge einer Therapie mit Nukleosidanaloga wie Lamivudin hervorgerufen wurden, in strukturellen Veränderungen des HBsAg resultieren und damit zu einer veränderten Antigenität dieses Proteins führen. Das bedeutet, dass Lamivudin-selektierte Mutanten prinzipiell das Potenzial haben, der Neutralisation durch Anti-HBs zu entgehen und somit auch zu Infektionen bei geimpften Individuen führen können (Chin and Locarnini, 2003; Torresi, 2002). Dies stellt jedoch eine Ausnahmesituation dar, da die üblichen Resistenzmutationen nicht in der Region der neutralisierenden Epitope des HBsAg zu finden sind.

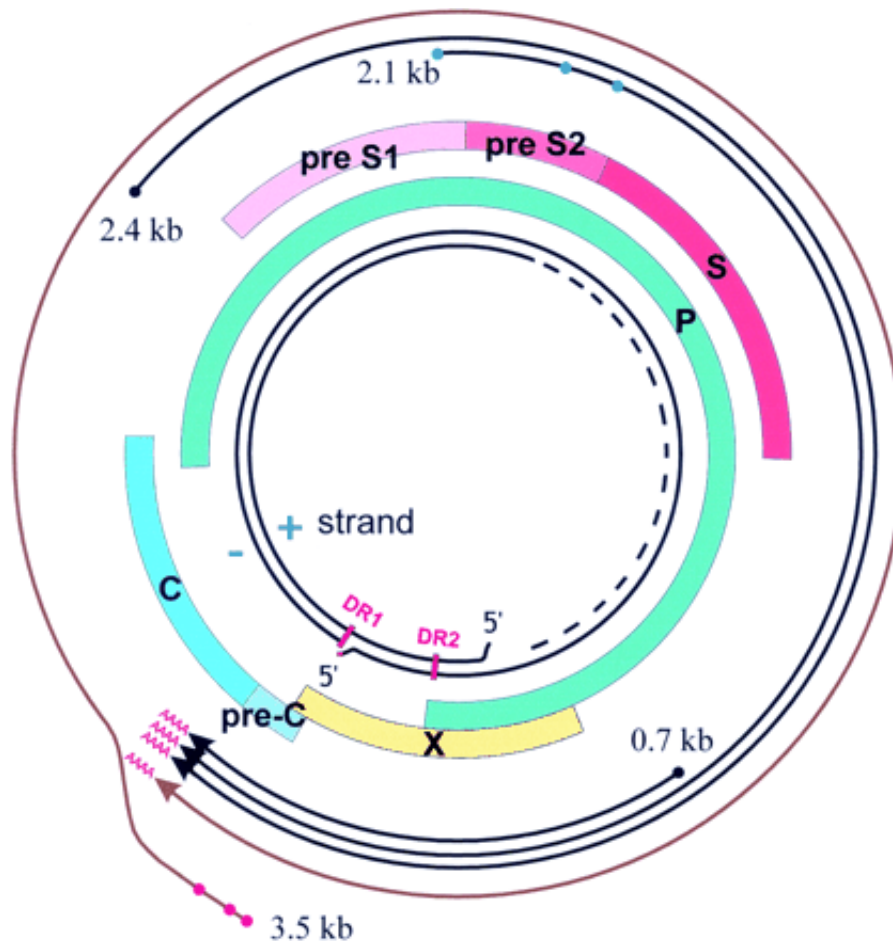


Abbildung 1: Schematische Darstellung des überlappenden HBV-Genoms mit den vier Transkriptionsabschnitten (Pfeile), wobei der längste der prägenomischen RNA entspricht. Variationen am 5'-Ende der 2,1 kbp- bzw. 3,5 kbp-Abschnitte werden durch Punkte markiert. DR1 und DR2 sind 11 bp lange Sequenzwiederholungen. Das Gen für die Hüllproteine (Pre-S1/Pre-S2/S) wird von dem Polymerase-Gen (P) komplett überlappt (Kidd-Ljunggren, Miyakawa, and Kidd, 2002).

1.2.2 Die HBV-Polymerase

Die HBV-Polymerase ist ein multifunktionales Protein, das die folgenden vier Regionen enthält: Das terminale Protein, die virale Polymerase (mit der Funktion einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase [reverse Transkriptase] und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase), die RNaseH und den Spacer, der teilweise ohne Einfluss auf die Polymerase-Aktivität entfernt werden kann.

Die reverse Transkriptase/DNA-Polymerase-Region lässt sich ihrerseits in fünf Domänen A, B, C, D und E unterteilen, die homolog zu Regionen der reversen Transkriptase des HI-Virus und anderer Retroviren sind. Die Domänen A, C und D sind an der Bindung der Nukleosidtriphosphate und der Katalyse beteiligt, während

die Domänen B und E eine Rolle bei der Positionierung der RNA-Matrize und des Primers zum katalytischen Zentrum spielen. Das katalytische Zentrum ist im Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat-Motiv (YMDD-Motiv) der Domäne C lokalisiert. Dieses Motiv findet sich gut konserviert in allen reversen Transkriptasen und ist die häufigste Lokalisation, an der es im Zuge einer Therapie mit Nucleosidanaloga zur Ausbildung von viralen Resistenzmutationen kommt. (Chin and Locarnini, 2003; Hussain and Lok, 1999; Papatheodoridis, Dimou, and Papadimitropoulos, 2002).

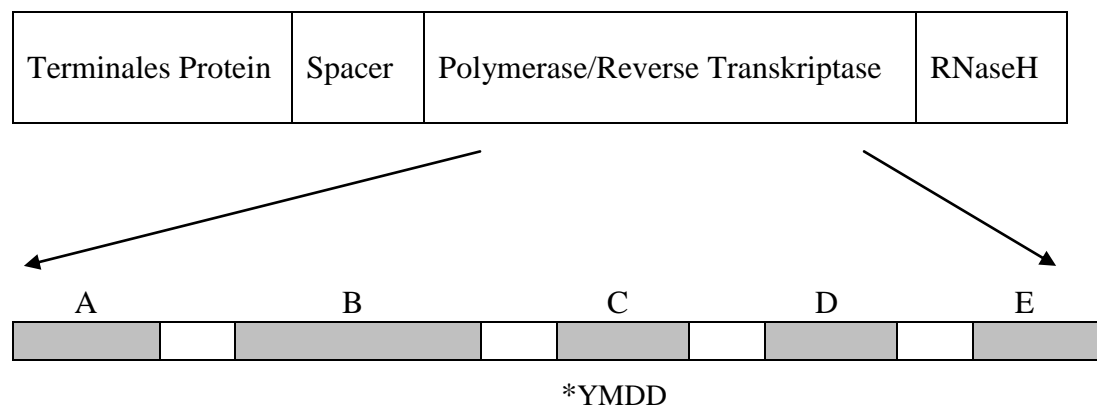


Abbildung 2: Schematische Darstellung der HBV-Polymerase und den fünf Domänen A bis E in der Polymerase/Reverse Transkriptase-Region. Die Domäne C enthält das YMDD-Motiv, in dem es am häufigsten zu Nucleosidanaloga-assoziierten Resistenzmutationen kommt (Papatheodoridis, Dimou, and Papadimitropoulos, 2002).

1.2.3 Virusreplikation

Die Replikation der Hepadnaviren unterscheidet sich von denen anderer Virusfamilien. Nach Bindung des PreS1-HBsAg an einen Rezeptor wird das Virus durch Endozytose aufgenommen. Nach dem Uncoating wird im Kern das partiell doppelsträngige DNA-Genom durch die Polymerase komplettiert und kovalent geschlossen. Diese „covalently closed circular“ (ccc) DNA-Form dient als Matrize zur Transkription von vier viralen RNAs: Neben drei kleineren viralen RNAs, die in linearer Form vorliegen und als mRNAs für die Translation dienen, transkribiert die RNA-Polymerase II der Wirtszelle eine etwa 3,5 kbp große zirkuläre RNA, die auch als prägenomische RNA bezeichnet wird. Sie unterscheidet sich von einer weiteren ca. 3,5 kbp großen RNA, die jedoch am 5'-Ende etwas länger ist und das Startkodon für die Synthese des HBeAg enthält. Als Prägenom dient lediglich die kürzere

Variante. Dieses Prägenom lagert sich im Zytoplasma mit der neu gebildeten Polymerase und neu synthetisierten HBcAg zu Nukleokapsiden zusammen. Das Prägenom wird in DNA revers transkribiert und anschließend abgebaut. Dann erfolgt die Synthese des meist inkompletten DNA(+)-Stranges durch die HBV-Polymerase. Im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat erhält das Kapsid seine Hülle und wird durch Exozytose ebenso wie das HBeAg freigesetzt.

1.3 Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis B-Virus

75 % der 350 Mio. chronisch HBV-Infizierten leben in Asien. In den USA und Europa liegt die Zahl der chronischen HBV-Träger bei 1,3 bzw. 1,1 Mio. (Clarke and Bloor, 2002). Innerhalb Europas beobachtet man ausgeprägte Unterschiede in der regionalen Verteilung: In Nordwesteuropa (Skandinavien, Vereinigtes Königreich) liegt der Anteil an chronisch HBV-Infizierten bei 0,1 % der Bevölkerung, in Süd- bzw. Osteuropa bis zu 8 %. (Custer et al., 2004). In Deutschland sind ca. 0,6 % der Bevölkerung chronische HBsAg-Träger, was einer Anzahl von ca. 500.000 Personen entspricht.

HBV kann im Blut sehr hohe Konzentration erreichen (bis zu 10×10^{11} Kopien/ml), so dass eine Infektion über kleinste Mengen von Blut oder Blutprodukten möglich ist. In geringerer Konzentration ist das Virus auch in anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar (u. a. Sperma und Vaginalsekret). Etwa zwei Drittel der Hepatitis B-Infektionen werden sexuell erworben. In vielen Fällen findet die Übertragung auch parenteral durch unmittelbaren bzw. mittelbaren Kontakt zu Blutprodukten bzw. kontaminierten Instrumenten statt. In Ländern mit hoher Inzidenz an Virusträgern wie beispielsweise in Südostasien und Zentralafrika wird HBV häufig perinatal (= vertikal) von der Mutter auf das Kind übertragen (Bielawski et al., 2004; Lai et al., 2003).

1.4 Pathogenese und klinischer Verlauf der Hepatitis B-Infektion

Die Hepatitis B ist eine Krankheit, bei der die auftretende Leberzellschädigung nicht auf aktive zytopathische Wirkung des Virus zurückzuführen ist, sondern die Immunreaktion des Wirtes das bestimmende pathogenetische Element darstellt. Im Verlauf der Infektion eliminieren zytotoxische T-Lymphozyten das HBV durch Zerstörung der infizierten Leberzellen oder sie sezernieren TNF-alpha und IFN-gamma, was zu einer Drosselung der Virusreplikation ohne direkte Zellzerstörung führt (Ganem and Prince, 2004). Der überwiegende Teil der Infektionen verläuft inapparent, wird also immunologisch frühzeitig beherrscht. Bei Erwachsenen verlaufen 90-95 % aller Infektionen selbstlimitierend mit vollständiger Ausheilung. In bis zu 1 % der Fälle verläuft die Erkrankung fulminant mit tödlichem Ausgang. Bei 5-10 % der Patienten zeigt sich ein chronischer Verlauf. Per Definition liegt eine chronische Hepatitis B dann vor, wenn das HBsAg im Blut länger als 6 Monate nachgewiesen werden kann (Rogendorf and Ross, 2004). Die HBsAg-Persistenz kann Jahre oder das ganze Leben andauern. Das Risiko, eine Leberzirrhose oder ein Leberzellkarzinom zu entwickeln, liegt bei chronischen HBV-Trägern etwa 200-mal höher als bei nicht-infizierten Personen (Beasley et al., 1981). Klinisch kann eine HBV-Infektion sowohl asymptomatisch verlaufen oder sich als entzündliche Lebererkrankung unter Beteiligung einer Leberzellschädigung manifestieren. Dies zeigt sich dann in einer Erhöhung der Transaminasenaktivität im Serum und/oder einer typischen Leberhistologie. Die bioptische Sicherung spielt dabei neben der virologisch-serologischen Diagnostik einer chronischen HBV-Infektion eine wichtige Rolle. Sie dient zur Diagnosesicherung bzw. -bestätigung, zur Bestimmung der entzündlichen Aktivität (Grading) und des Fibroseausmaßes (Staging) sowie zur Klärung der Ätiologie, insbesondere von Komorbiditäten. Zudem fließt sie mit in die Therapieplanung ein (Cornberg et al., 2007).

1.5 Therapie der chronischen HBV-Infektion

Die Indikationsstellung zur antiviralen Therapie berücksichtigt in erster Linie die Höhe der Virusreplikation im Serum, die Höhe der Transaminasen sowie den Entzündungs- und Fibrosestatus (Grading und Staging der Leberbiopsie). Diese Kriterien dienen im weiteren Verlauf auch zur Definition des Therapieansprechens. Dabei ist virologisch die HBeAg/Anti-HBe-Serokonversion, der dauerhafte Abfall der HBV-DNA auf mindestens $<1,0 \times 10^4$ Kopien/ml, im Idealfall <300 Kopien/ml sowie der HBsAg-Verlust das therapeutische Ziel (Cornberg et al., 2007).

Grundsätzlich kommen zwei Therapieoptionen zum Einsatz, denen unterschiedliche Prinzipien zu Grunde liegen: Zum einen die Immunmodulation/-stimulation mit Interferon (IFN)-alpha mit potentieller Chance zur Ausheilung, zum anderen der Einbau falscher Basenbausteine durch Nukleosid- und Nukleotidanaloga, die eine Replikationsminderung bzw. Viruskontrolle bewirken.

Beim Interferon alpha stehen die nicht pegylierten Formen IFN-alpha-2a (Roferon®) und IFN-alpha-2b (Intron®), sowie die pegylierten Formen PEG-IFN-alpha-2a (Pegasys®) und PEG-IFN-alpha-2b (PEGIntron®) zur Verfügung. Zu den Nukleosidanaloga zählen Lamivudin (Zeffix®), Entecavir (Baraclude®) und Telbivudin (Sebivo®), zu den Nukleotidanaloga Adefovir-Dipivoxil (Hepsera®) und Tenofovir (Viread®). In den letzten Jahren wurden Lamivudin und Adefovir zunehmend durch Entecavir und Tenofovir als Standardtherapie abgelöst, da bei den letztgenannten Wirkstoffen deutlich seltener Resistenzen auftreten. Generell müssen bei der Planung zur Therapie einer chronischen HBV-Infektion verschiedene Faktoren beachtet werden. Dazu zählt zunächst die Prüfung, ob eine IFN-Therapie grundsätzlich möglich und erfolgsversprechend ist. Bei der Auswahl von Nukleosid- oder Nukleotidanaloga ist das Stadium der Lebererkrankung sowie die Höhe der Virämie zu berücksichtigen. Zudem ist hier die Behandlung bei nicht ausreichendem Ansprechen nach spätestens 6 Monaten anzupassen. Schließlich sollte beim Vorliegen einer Leberzirrhose primär eine Kombinationstherapie erfolgen bzw. ein Wirkstoff mit geringen Resistenzraten ausgewählt werden (Cornberg et al., 2007).

1.5.1 Interferon alpha

IFN-alpha kommt bei der primären Behandlung einer chronischen HBV-Infektion bei HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten mit kompensierter Lebererkrankung zum Einsatz. Die Applikation von IFN-alpha über einen Zeitraum von drei bis vier Monaten bei HBeAg-positiven Patienten resultiert in 30-50 % der Fälle in einer anhaltenden Remission der Krankheit, das heißt Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe mit Fehlen einer quantitativ nachweisbaren Virusreplikation (in insensitiven Hybridisierungsassays) und Übergang in einen sogenannten asymptomatischen HBsAg-Trägerstatus. Unter diesen Patienten, die auf die Therapie ansprechen, kommt es im weiteren Verlauf in 10-15 % der Fälle zu einer Serokonversion von HBsAg zu Anti-HBs und damit zu einer Ausheilung der chronischen HBV-Infektion. Bei HBeAg-negativen, anti-HBe-positiven Patienten (Precore-Mutante) sind die Langzeitergebnisse deutlich ungünstiger, da es nach Therapieende häufig zu Rückfällen und damit zu einem Wiederanstieg der Viruslast kommt (Chin and Locarnini, 2003).

Folgende Faktoren sind mit einem IFN-Ansprechen assoziiert und damit erfolgsversprechend für diese Therapieoption: HBV-Genotyp A, eine niedrige Viruslast ($<1,0 \times 10^6$ Kopien/ml), mindestens 2-fach erhöhte Transaminasen (idealerweise >5 -fach) sowie nicht vorbehandelte Patienten (Cornberg et al., 2007).

1.5.2 Nukleosid- und Nukleotidanaloga

Die Einführung von Nukleosid- und Nukleotidanaloga stellt einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie der chronischen Hepatitis B dar. Die Substanzen können oral appliziert werden und weisen nur wenige Nebenwirkungen auf, so dass sie auch nach längerer Einnahme meist gut vertragen werden. Die Auswahl der Medikamente setzt die Berücksichtigung der antiviralen Effektivität, Dauerhaftigkeit des Ansprechens, Resistenzbarriere sowie des Stadiums der Lebererkrankung voraus.

Der Mechanismus, über den die Nukleosid- und Nukleotidanaloga wirken, liegt in der Inhibition der viralen Polymerase-Aktivität. Bei den Nukleosidanaloga wird die Substanz zunächst durch schrittweise Phosphorylierung durch Kinasen in den Hepatozyten über ein Nukleosidmonophosphat-, Nukleosidbiphosphat- schließlich in

ein Nucleosidtriphosphatäquivalent umgewandelt. Im Gegensatz dazu besitzen die Nucleotidanaloga bereits eine Phosphatgruppe im Molekül, und die bei Nucleosidanaloga notwendige Umwandlung in ein Monophosphat entfällt. Die phosphorylierten Analoga konkurrieren dann mit den natürlichen Nucleotiden um den Einbau in die virale DNA durch die HBV-Polymerase. Aus dem Fehlen der 3'-OH-Gruppe bei den Nucleosid- und Nucleotidanaloga resultiert nach Einbau in die DNA-Kette ein Abbruch der HBV-DNA-Synthese. Dabei scheinen die Nucleosid- und Nucleotidanaloga keinen Effekt auf die zelluläre DNA-Polymerase zu haben (Papatheodoridis, Dimou, and Papadimitropoulos, 2002).

Lamivudin (2'3'-Dideoxy-3'Thiacytidin) ist ein Pyrimidinanalogon, genauer gesagt ein Cytosin-Analogon. Es wurde ursprünglich für die Behandlung von HIV-Infektionen entwickelt, im Laufe der klinischen Anwendung zeigte sich aber, dass dieses Medikament auch ein geeigneter Inhibitor der Virusreplikation bei Hepatitis B-Infektion ist. Studien konnten belegen, dass die Behandlung von HBeAg-positiven chronisch HBV-Infizierten mit täglich 100 mg Lamivudin über einen Zeitraum von 12 Monaten in 16 % der Fälle mit HBeAg-Serokonversion, Fehlen einer nachweisbaren Virusreplikation und der Normalisierung der Transaminasen einhergeht. Nach 24 Monaten kontinuierlicher Behandlung sind es bereits 27 %, nach drei Jahren bis zu 65 % (Chin and Locarnini, 2003).

Eine wesentliche Komplikation beim Einsatz von Lamivudin als Monotherapie stellt das Auftreten von Resistenzen durch Mutationen im YMDD-Motiv der katalytischen Domäne (Domäne C) der HBV-Polymerase dar. Die Inzidenz von YMDD-Mutanten steigt von 15-32 % im ersten Jahr auf 67-69 % im fünften Jahr der Behandlung (Lai et al., 2003). Der Austausch von Methionin (M) durch Valin (V) oder Isoleucin (I) an der Position 204 des Polymerase-Gens (rtM204V/rtM204I) stellt die häufigste Mutation dar. Die zweithäufigste Resistenzmutation befindet sich an der Position 180 der Region B mit einem Austausch von Leucin (L) durch Methionin (M) (rtL180M). Die Mutation rtM204V entwickelt sich häufig in Kombination mit der rtL180M Mutation, wohingegen die rtM204I Mutation meist alleine auftritt (Chin and Locarnini, 2003; Papatheodoridis, Dimou, and Papadimitropoulos, 2002).

Es wird angenommen, dass der Effekt von solchen Resistenzmutationen in der Veränderung des katalytischen Zentrums der reversen Transkriptase liegt, so dass Lamivudin schlechter binden kann, was die beobachtete phänotypische Resistenz erklärt.

Während vor einigen Jahren beim Auftreten Lamivudin-resistenter HBV-Varianten als zusätzliche Option lediglich Adefovir zur Verfügung stand, erfolgt inzwischen die Standardtherapie mit Entecavir und Tenofovir, die nur geringe Resistenzraten aufweisen (Cornberg et al., 2007; Manns et al., 2004; Niederau, 2007).

1.6 HBV-Genotypen

1.6.1 Grundlagen der Genotyp-Einteilung

Die Klassifikation von HBV basierte anfangs auf der Unterscheidung in 9 verschiedene Subtypen (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr_q+, adr_q-), die sich aus der Reaktivität Subtyp-spezifischer Antikörper gegen das HBsAg ableiten lässt. Darüber hinaus wurde ein neues Klassifikationssystem entwickelt, dem der Vergleich der kompletten genomischen Sequenz des Virus zugrunde liegt. Diese Einteilung löste in den letzten Jahren zunehmend die serologische Subtyp-Bestimmung ab. Im Jahr 1988 beschrieben Okamoto et al. die ersten vier Genotypen, bezeichnet mit A, B, C und D (Okamoto et al., 1988). 1994 konnten Norder et al. zwei weitere HBV-Genotypen nachweisen, die mit E und F bezeichnet wurden (Norder, Courouce, and Magnus, 1994). Genotyp G wurde im Jahr 2000 erstmals beschrieben und Genotyp H, der phylogenetisch eng mit dem Genotyp F verwandt ist, wurde 2002 entdeckt (Kidd-Ljunggren, Miyakawa, and Kidd, 2002; Stuyver et al., 2000). Damit sind zur Zeit acht verschiedene HBV-Genotypen bekannt. Die Einteilung dieser acht Genotypen basiert auf einer Nukleotidvariation von mindestens 8 % bezogen auf das gesamte Genom (Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Miyakawa and Mizokami, 2003; Niesters, Pas, and de Man, 2005).

Wie in Tabelle 1 dargestellt, weisen die HBV-Genotypen unterschiedliche Genomlängen auf. Die Genotypen B, C, F und H sind 3215 Nukleotide lang. Der Genotyp D weist eine 33 Nukleotide lange Deletion im PreS1-Gen auf und hat somit eine Länge von 3182 Nukleotiden. Die Genotypen E und G zeigen eine 3 Nukleotide lange Deletion in der gleichen Region der Polymerase. Genotyp A unterscheidet sich insofern von den anderen Genotypen, als er eine Insertion von 6 Nukleotiden in der Domäne des terminalen Proteins der Polymerase und im überlappenden Core-Gen

aufweist. Der Genotyp G hat mit einer Insertion von 36 Nukleotiden im 5'-Bereich des Core-Genes das längste Genom (Bartholomeusz and Schaefer, 2004).

Tabelle 1: Genomlängen und Proteingrößen der HBV-Genotypen (modifiziert nach (Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Stuyver et al., 2000))

Genotyp	Genomlänge (Nukleotide)	HBV-Proteine (Anzahl der Aminosäuren)						
		Precore	HBcAg	PreS1	PreS2	HBsAg	HBpol	HBx
A	3221	29	185	119	55	226	845	154
B	3215	29	183	119	55	226	843	154
C	3215	29	183	119	55	226	843	154
D	3182	29	183	108	55	226	832	154
E	3212	29	183	118	55	226	842	154
F	3215	29	183	119	55	226	843	154
G	3248	29	195	118	55	226	842	154
H	3215	29	183	119	55	226	843	154

1.6.2 HBV-Genotypverteilung weltweit

Die acht HBV-Genotypen zeigen eine charakteristische weltweite Verbreitung: Genotyp A ist pandemisch, ist aber vor allem in Nordwesteuropa, Nordamerika und Zentralafrika verbreitet. Genotyp B und C kommen in Südostasien sehr häufig vor: Genotyp B findet sich in Japan, Indonesien, China und Vietnam, Genotyp C wird in Japan, Korea, Polynesien, China, Vietnam sowie in Australien gefunden. Ähnlich dem Genotyp A ist auch der Genotyp D pandemisch mit einem relativ hohen Vorkommen im Mittelmeerraum, dem Nahen Osten, einem Großteil der ehemaligen Sowjetunion sowie Indien. Genotyp E wird in Westafrika gefunden, Genotyp F in Süd- und Zentralamerika. Für den Genotyp G liegen zur Zeit nur wenige Daten vor. Bisher wurde dieser Genotyp in Frankreich, den USA, Deutschland und Mexiko identifiziert. Es wird angenommen, dass dieser Genotyp seinen Ursprung in Zentralamerika hat. Genotyp H wurde in Zentralamerika nachgewiesen (Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Kao, 2002; Lai et al., 2003; Schaefer, 2005; Vivekanandan et al., 2004). Die Abbildung 3 verschafft einen Überblick über die globale Verteilung der Genotypen und ihrer einzelnen Ausbreitungsgebiete.

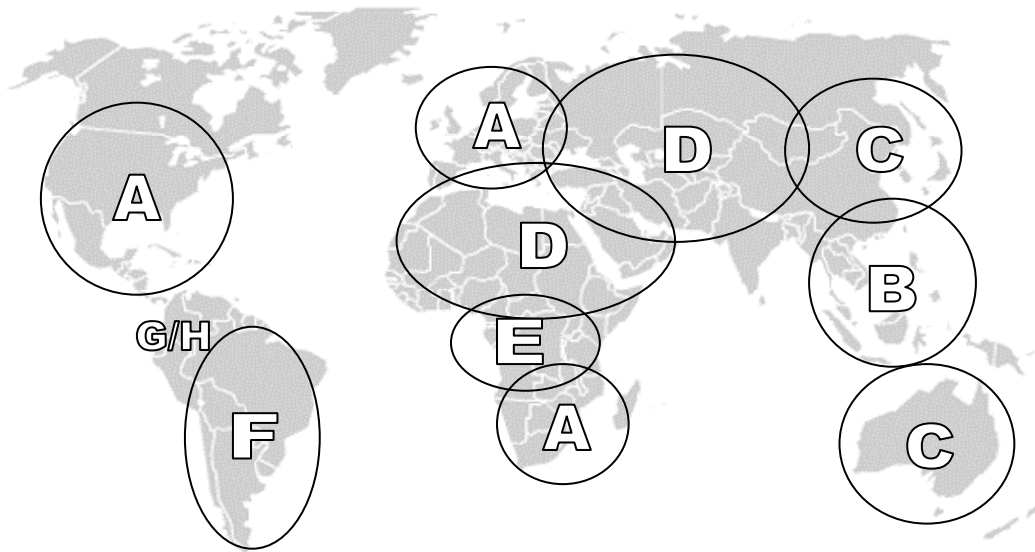


Abbildung 3: Weltweite Verteilung der HBV-Genotypen A bis H.

1.6.3 Klinische Relevanz der HBV-Genotypen

Studien der letzten Jahre, die vorwiegend in asiatischen Ländern durchgeführt wurden, zeigten, dass die HBV-Genotypen Einfluss auf die klinische Manifestation chronischer Lebererkrankungen im Wirtsorganismus nehmen können. So dominiert Genotyp C in asiatischen Ländern unter Patienten mit Leberzirrhose und älteren HCC-Patienten, wohingegen Genotyp B mit der Entwicklung eines HCC unter nicht-zirrhotischen, jüngeren Patienten assoziiert ist. Außerdem gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass der HBV-Genotyp sowohl die HBeAg-Serokonversion als auch Mutationsformen in der Precore- und Core Promoter-Region beeinflusst (Kao, 2002). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Heterogenität bezüglich der Krankheitsmanifestation und des Therapieansprechens unter chronisch HBV-Infizierten in verschiedenen Teilen der Welt zumindest teilweise auf Unterschiede in der Genotypverteilung zurückzuführen ist (Bielawski et al., 2006). Für den europäischen Raum liegen bislang nur sehr wenige Daten vor, wobei Genotyp A häufiger mit chronischer Lebererkrankung assoziiert scheint als Genotyp D (Kao, 2002). Bezüglich klinischer extrahepatischer Manifestationen konnte in einer Studie aus Frankreich keine signifikante Beziehung zwischen Genotyp und demographischen Charakteristika, Risikofaktoren und Laborparametern konstatiert werden (Cacoub et al., 2005).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In zahlreichen Ländern sind bereits Studien durchgeführt worden, die sich mit der HBV-Genotypverteilung in dem jeweiligen Land auseinandergesetzt haben. In Deutschland gibt es nur wenige Daten zur HBV-Genotypverteilung. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die HBV-Genotypen eines definierten Patientenkollektivs zu bestimmen, um eine Aussage zu ihrem Auftreten in Deutschland treffen zu können. Zudem sollte untersucht werden, ob sich unter den verschiedenen HBV-Genotypen Unterschiede bezüglich demographischen, virologischen und klinischen Parametern ableiten lassen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientenproben

Aus dem Zeitraum vom 01.01.1997 bis einschließlich zum 15.11.2004 wurden alle Patienten der Infektionsambulanz der Universitätsklinik Würzburg identifiziert, die wegen einer chronischen HBV-Infektion mit Nukleosid- und/oder Nukleotidanaloga behandelt wurden. Zur Durchführung von virologischen Routineuntersuchungen wurden von diesen Patienten regelmäßig Serum- und/oder EDTA-Blutproben an das Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg geschickt. Restmaterial von diesen Proben wurde nach Abschluss der Routinebestimmungen bei -20°C gelagert. Die jeweils letzte verfügbare Probe vor Beginn der Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga wurde für die Genotyp-Untersuchungen verwendet. Bei Patienten, deren Viruslast der entsprechenden Probe zu gering war, wurde für die Genotypisierung eine alternative Probe mit höherer Viruslast ausgewählt. Die demographischen und epidemiologischen Daten wurden dennoch auf die letzte Probe vor Therapiebeginn bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Zur Isolierung von HBV-DNA aus den Patientenproben kam das High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim) zum Einsatz. Das Prinzip dieser Extraktion beruht auf Freisetzung von viraler DNA durch Viruslyse und anschließender Bindung an ein Glasfaser-Vlies in einem speziellen Zentrifugationsröhrchen. Die DNA bleibt an diesem Vlies gebunden, während in einer Abfolge von Waschschrritten kontaminierende zelluläre Komponenten entfernt werden. Schließlich wird die DNA von dem Vlies gelöst, um als Matrize für eine PCR zu dienen.

Das Extraktionskit wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet: Zunächst wurden je 200 µl der Serum- oder Plasmaprobe mit 50 µl Proteinase K und mit 200 µl Bindungspuffer mit Poly[A]-Bindungsprotein versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 72°C. Nach der Inkubation wurde der Probe ein Volumen von 100 µl Bindungspuffer ohne poly [A] hinzugefügt und wieder auf dem Vortexer gemischt. Im Folgenden schlossen sich zwei Zentrifugationsschritte an, bei denen die Probe (je 550 µl) in eine Zentrifugationssäule gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran wurde jeweils das Filtrat zusammen mit dem Sammelröhrchen verworfen und in ein neues Sammelröhrchen eingesetzt. Nach Zugabe von 450 µl Waschpuffer wurde erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozess wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Als letzter Arbeitsschritt erfolgte die Lösung der gereinigten DNA aus der Zentrifugationssäule. Dazu wurden 50 µl Elutionspuffer auf die Säule pipettiert und anschließend für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in sauberen Gefäßen aufgefangen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nach jeweils maximal fünf Patientenproben wurde eine Wasserprobe als Negativkontrolle in identischer Weise abgearbeitet.

2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von HBV-Sequenzen wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz mittels PCR durchgeführt. In dem Reaktionsansatz waren folgende Bestandteile enthalten:

5,0 µl Template-DNA
0,5 µl Primer HB364s (5 µM; TIB Molbiol, Berlin)
0,5 µl Primer HB1013a (5 µM; TIB Molbiol, Berlin)
0,5 µl dNTPs (je 20 mM; Amersham, Braunschweig)
0,3 µl HotStarTaq-Polymerase (Qiagen, Hilden)
5,0 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden)
38,2 µl H₂O

Folgende Primer-Sequenzen wurden dabei verwendet:

HB364s: 5' *TGGTTATCGC TGGATGTGTC*

HB1013a: 5' *CCCAAAAGAC CCACAATTC*

Für einen PCR-Lauf wurde jeweils gemäß der Probenanzahl ein „Master“-Mix angesetzt und auf die einzelnen Proben verteilt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt) mit folgendem Temperaturprofil:

95°C/ 12 min (Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase)
94°C/ 30 s (Denaturierung)
60°C/ 30 s (Annealing)
72°C/ 30 s (Elongation)
bei 50 Zyklen

Nach Beendigung der PCR erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in 3 %-igen Agarosegelen. Dazu wurden jeweils 3 µl Ladepuffer und je 2 µl PCR-Produkt in die Geltaschen pipettiert und aufgetrennt. DNA wurde durch Färbung mit

Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

Beim Ansetzen der PCR ist es wichtig, sorgfältig und kontaminationsfrei zu arbeiten. Daher wurden die Arbeitsschritte im Prä- und Post-PCR-Bereich räumlich und im Hinblick auf die dabei verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und Gerätschaften strikt voneinander getrennt.

2.2.3 Aufreinigung von positiven PCR-Produkten

Die in der Agarose-Gelelektrophorese positiven PCR-Reaktionen wurden mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um Primerreste, Nukleotide, Polymerasen und Salze von den DNA-Fragmenten zu entfernen. Bei der Aufreinigung wurde gemäß den Herstellervorgaben gearbeitet:

Als erstes wurde das PCR-Produkt im Verhältnis 1:5 mit PB-Puffer versetzt, das heißt, bei einem Ausgangsvolumen von 50 µl PCR-Produkt wurden 250 µl PB-Puffer hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine Zentrifugationssäule gegeben und anschließend für 30-60 s zentrifugiert. Das Filtrat und das Sammelröhrchen wurden verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen platziert. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer (Waschpuffer) zugefügt und erneut zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die aufgereinigte DNA mit 40 µl H₂O per Zentrifugation aus der Zentrifugationssäule eluiert.

Ein Teil der Proben wurde mit dem Pipettierautomaten Genesis Workstation 150 (Tecan, Crailsheim) und der Filtrationsplatte Multiscreen-HTS-PCR-Plate (Millipore Corporation, Billerica USA) automatisiert aufgereinigt. Entsprechend den Herstellerangaben wurden dabei 40 µl PCR-Produkt verwendet und die reine DNA in 60 µl nukleasefreies Wasser eluiert.

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode mit dem BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems, Darmstadt). Ein Sequenzierungsansatz enthielt jeweils folgende Bestandteile:

- 2,0 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1,0 µl Primer (5 µM; TIB Molbiol, Berlin)
- 1,0 µl BigDye Terminator v3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- 1,0 µl 2,5x Puffer (200 mM TrisHCl, pH 9,0; 5 mM MgCl₂)

Die Sequenzierungsreaktionen wurden in beide Richtungen durchgeführt. Dabei kamen folgende Primer zum Einsatz:

HB366s: 5' *GTTATCGCTG GATGTGTCTG*

HB1013a: 5' *CCCAAAGAC CCACAATTC*

Die Sequenzierungsreaktionen wurden im T3-Cycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

- 96°C/10 s (Denaturierung)
- 50°C/5 s (Annealing)
- 60°C/4 min (Elongation)
- bei 25 Zyklen

Anschließend wurden die Sequenzierungsprodukte mit dem Sequenzierautomaten ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

2.2.5 Auswertung der HBV-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms SeqMan II aus dem Lasergene Software-Paket (DNAStar, Madison WI, USA) ausgewertet. Nach dem Trimmen der Primer-Sequenzen wurde aus den gegenläufigen Sequenzen eines PCR-Produkts ein Contig erstellt. Anschließend wurden die Elektropherogramme der Sequenzen eines Contigs am Computer dargestellt und editiert. Dabei wurden nicht übereinstimmende Basen und Basengemische (sogenannte „Wobbles“) gesucht und gegebenenfalls korrigiert. Darauf hin wurde die Contig-Sequenz in das FastA-Format exportiert, um sie dem Programm MegAlign des Lasergene Software-Pakets zur Genotypisierung zuzuführen.

2.2.6 Genotypisierung

Mit Hilfe des Programms MegAlign wurden die Genotypen der Sequenzen bestimmt. Dabei wurden die FastA-Files der auszuwertenden Patientenproben mit HBV-Referenz-Genotypen der GenBank Database mittels Clustal W verglichen. Folgende Referenzsequenzen kamen dabei zum Einsatz:

Tabelle 2: Als Referenz verwendete HBV-Sequenzen aus der Datenbank GenBank (Schaefer, 2007)

Genotyp	GenBank Accession-Nr.
A	X02763
B	D00330
C	M12906
D	V01460
E	X75657
F	X69798
G	AF160501
H	AY090454

Nach der Genotypisierung wurde die Zuordnung zu den Genotypen in einem phylogenetischen Baum dargestellt. Die phylogenetische Analyse ist eine Methode zur Abschätzung der verwandtschaftlichen und evolutionären Beziehung von Sequenzen untereinander.

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten zu Altersverteilung, Viruslast, laborchemischen Parametern und Therapiedauer in Abhängigkeit vom Genotyp wurden mit dem Mann-Whitney-Test analysiert, die Geschlechterverteilung unter den einzelnen Genotypen sowie die Genotypverteilung nach Herkunftsland mit dem Chi Quadrat-Test bzw. dem Fisher's Exact Test. Als Statistikprogramm diente Prism 3 von Macintosh (GraphPad). Ergebnisse mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten des Patientenkollektivs

Für den Zeitraum vom 01.01.1997 bis zum 15.11.2004 wurden 66 Patienten identifiziert, die wegen einer chronischen HBV-Infektion mit Nukleosid- oder Nukleotidanaloga behandelt worden waren. Davon waren 52 (78,8 %) männlich und 14 (21,2 %) weiblich. Der Altersmedian lag bei 43 Jahren (Spannweite 22-74 Jahre). Der Median der Viruslast in der letzten Probe vor der ersten Therapie mit Nukleosid- oder Nukleotidanaloga lag bei $7,0 \times 10^7$ Kopien/ml.

Von den 66 Patienten konnte in 62 Fällen HBV-DNA für die Genotypisierung amplifiziert werden. Bei 12 Proben war die initiale Viruslast zu gering gewesen ($< \text{ca. } 1,0 \times 10^3$ Kopien/ml), sodass in diesen Fällen eine andere Probe mit höherer Viruslast ausgewählt wurde. Dennoch konnte bei 4 Patienten trotz Untersuchung einer alternativen Probe kein ausreichendes HBV-PCR-Produkt erzielt werden, um eine Genotypisierung durchzuführen.

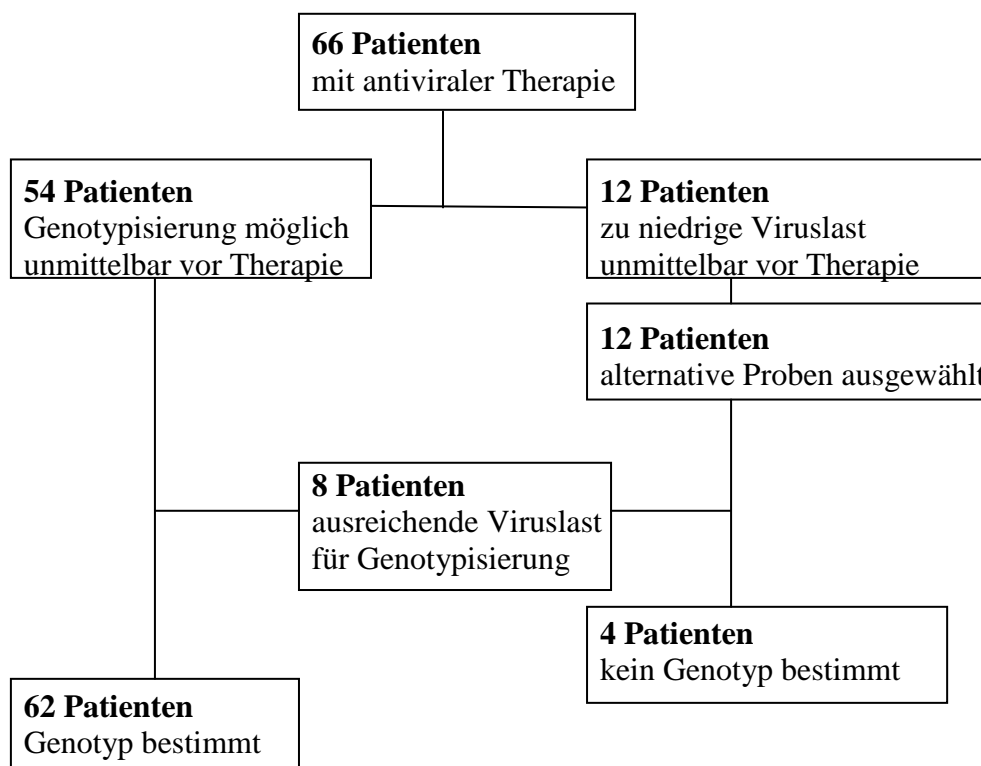


Abbildung 4: Von insgesamt 66 Patienten konnte in 62 Fällen der Genotyp bestimmt werden.

Von den 62 genotypisierten Patienten waren 50 (80,6 %) männlich und 12 (19,4 %) weiblich, der Altersmedian wurde mit 43 Jahren (Spannweite 22-74 Jahre) bestimmt und die mediane Viruslast vor Therapiebeginn lag bei $7,0 \times 10^7$ Kopien/ml. Von den 4 nicht genotypisierten Patienten waren jeweils 2 männlich bzw. weiblich. Der Altersmedian ergab hier 45 Jahre. Bei zu niedriger Viruslast der initial ausgewählten Probe lag die mediane Viruslast der alternativen Probe bei den 4 Patienten bei $8,6 \times 10^3$ Kopien/ml. Die demographischen Daten und die Viruslasten der genotypisierten sowie der nicht genotypisierten Patienten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Demographische Daten und Viruslasten der genotypisierten und der nicht genotypisierten Patienten

	genotypisiert (n=62)	nicht genotypisiert (n=4)
Geschlecht (m/w)	50/12	2/2
<i>Alter (Jahre)</i> Median (Spannweite)	43 (22-74)	45 (31-73)
<i>Viruslast (Kopien/ml)</i> Median (Spannweite)	$7,0 \times 10^7$ ($3,0 \times 10^4 - 5,2 \times 10^9$)	$8,6 \times 10^3$ ($7,2 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$)

3.2 Sequenzierungsergebnisse

3.2.1 Phylogenetischer Baum

Die Abbildung 5 zeigt den phylogenetischen Baum, in dem die untersuchten Proben mit Referenzsequenzen aus der Datenbank GenBank verglichen wurden. Alle Proben ließen sich den Genotypen A, B, C und D zuordnen. Die Genotypen E, F, G und H wurden nicht gefunden.

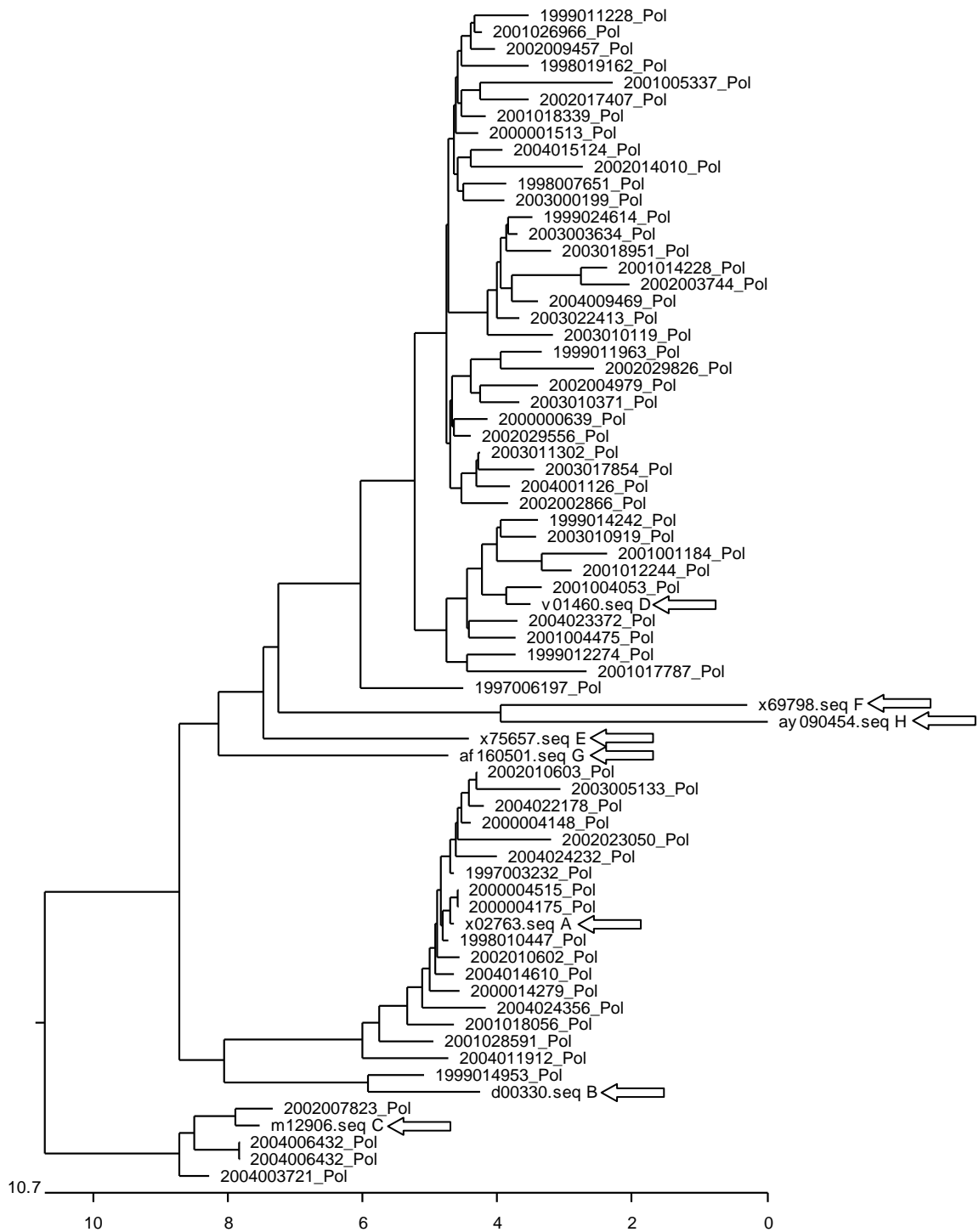


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der partiellen rt-Region des HBV-Polymerase-Gens (nt 255-825). Vergleich von HBV-Sequenzen aus 62 Patientenproben mit HBV-Referenz-Genotypen der Datenbank GenBank. Die Referenz-Genotypen sind durch Pfeile (\leftarrow) markiert.

3.2.2 Genotypverteilung

Aus den 62 PCR-Amplifikaten aus der partiellen rt-Region des HBV-Polymerase-Gens wurde durch Vergleich mit Referenzsequenzen der HBV-Genotyp bestimmt. Dabei wurden insgesamt vier verschiedene Genotypen gefunden (Abbildung 6). Genotyp D war mit 40 Fällen (64,5 %) der vorherrschende Genotyp, Genotyp A wurde in 17 Fällen (27,4 %) nachgewiesen. Mit dem Genotyp C waren 4 Patienten (6,5 %) infiziert, der Genotyp B zeigte sich in einem Fall (1,6 %).

Im Zuge dieser Arbeit wurden mögliche Zusammenhänge zwischen HBV-Genotyp und Patientenalter, Geschlecht, Herkunftsland, laborchemischen Parametern, Viruslast vor Therapiebeginn und der antiviralen Therapie untersucht. Da 57 der 62 genotypisierten Patienten den Genotypen A und D zugeordnet werden konnten, wurden diese Auswertungen hauptsächlich auf die Genotypen A und D beschränkt.

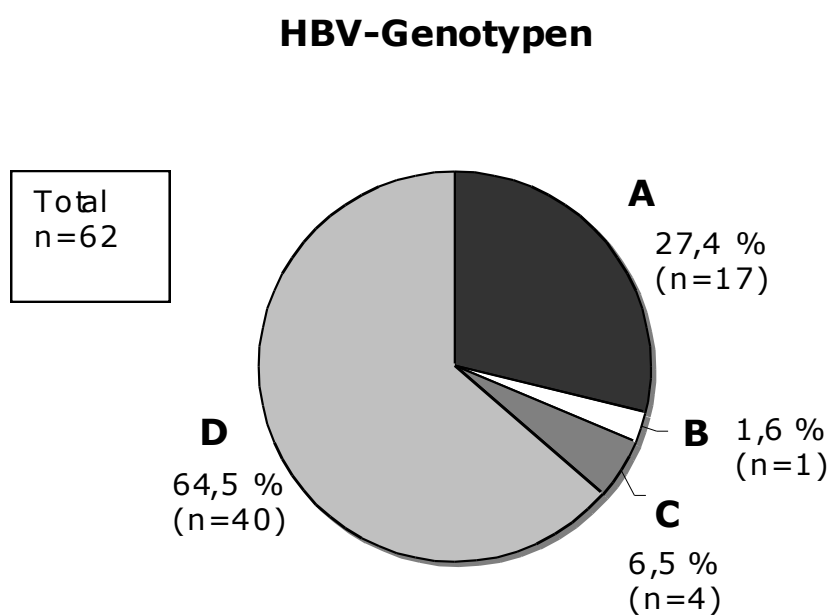


Abbildung 6: HBV-Genotypverteilung der 62 genotypisierten Patienten.

3.2.3 Genotyp und Herkunftsland

Aufgrund einer unzureichenden Datenlage konnte nur von 21 Patienten der ethnische Hintergrund bzw. das Herkunftsland ermittelt werden. Angaben zum Infektionsrisiko der untersuchten Patienten wurden nicht erfasst. Von den insgesamt 5 Genotyp A-Fällen, deren Herkunft bestimmt wurde, kamen alle Patienten aus Deutschland. Die Gruppe der Genotyp D-Infizierten wies bei 15 ermittelten Herkunftsländern eine heterogene Verteilung auf: 3 Patienten kamen aus Deutschland, 7 aus der Türkei und jeweils ein Patient aus Griechenland, Pakistan, Rumänien, Russland und Serbien. Zusätzlich kam ein Genotyp C-Infizierter aus Kasachstan. Die Herkunft des einzigen Genotyp B-Infizierten konnte nicht bestimmt werden.

Trotz der geringen Fallzahl zeigte sich, dass bei den Patienten mit Genotyp A Deutschland als Herkunftsland signifikant häufiger vertreten war als bei den Patienten mit Genotyp D ($P=0,0036$) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Genotypverteilung nach Herkunftsland *

	Genotyp A	Genotyp D	Genotyp C
Deutschland	5 **	3 **	0
nicht Deutschland	0	12	1
Türkei		7	
Griechenland		1	
Pakistan		1	
Rumänien		1	
Russland		1	
Serbien		1	
Kasachstan			1

* Informationen über das Herkunftsland lagen für 21 der 62 Patienten vor.

** Deutschland als Herkunftsland signifikant häufiger ($P=0,0036$) bei Patienten mit Genotyp A als bei Genotyp D.

3.2.4 Altersverteilung in Abhängigkeit vom Genotyp

Der Altersmedian von Patienten mit Genotyp A lag bei 50 Jahren (Spannweite 23-73 Jahre) und bei Genotyp D bei 43 Jahren (22-74 Jahre). Der Unterschied des Altersmedian zwischen Patienten mit Genotyp A- und Genotyp D-Infektion war statistisch nicht signifikant ($P=0,096$). Die Altersverteilung und der Median für den jeweiligen Genotyp ist in Abbildung 7 dargestellt.

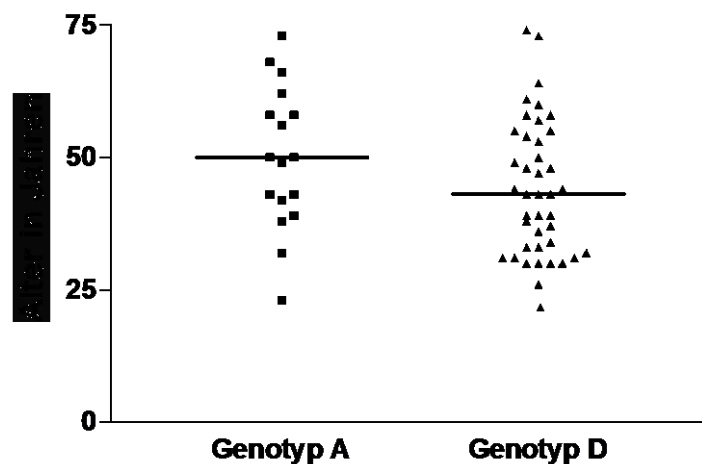


Abbildung 7: Altersverteilung für Patienten mit Genotyp A und D. Der Medianwert ist als horizontale Linie dargestellt.

3.2.5 Viruslast in Abhängigkeit vom Genotyp

In der Gruppe der Genotyp A-Infizierten wurde der Median der Viruslast vor der Beginn der Therapie mit Nukleosid- oder Nukleotidanaloga mit $2,0 \times 10^8$ Kopien/ml (Spannweite $3,0 \times 10^4 - 2,0 \times 10^9$ Kopien/ml) bestimmt, für Patienten mit Genotyp D lag er bei $6,0 \times 10^7$ Kopien/ml ($5,9 \times 10^4 - 5,2 \times 10^9$ Kopien/ml). Im Vergleich dieser beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Viruslast nachgewiesen werden ($P=0,39$) (Abbildung 8).

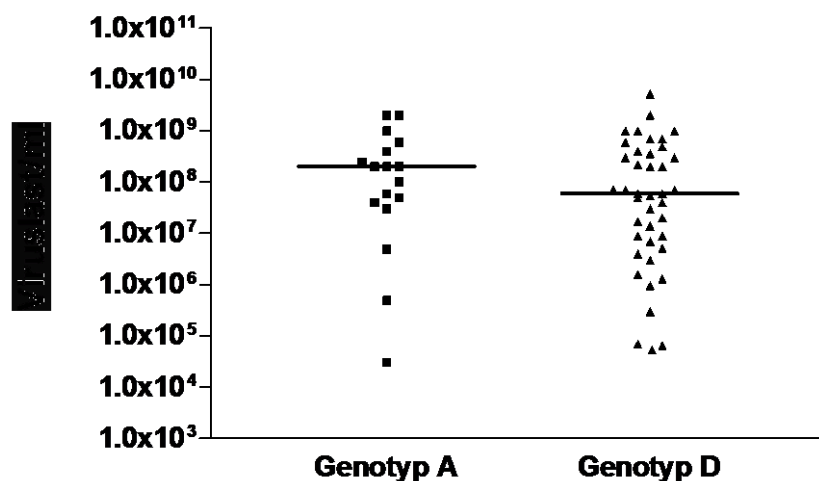


Abbildung 8: Hepatitis B-Viruslastverteilung bei Patienten mit Genotyp A und D. Der Median ist als horizontale Linie dargestellt.

3.2.6 Antivirale Therapie in Abhängigkeit vom Genotyp

Zu allen 66 Patienten wurden Daten zur antiviralen Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga sowie IFN-alpha gesammelt. Alle Patienten wurden mit Lamivudin behandelt, wobei 32 ausschließlich mit Lamivudin behandelt wurden. 23 Patienten wurden nach einer initialen IFN-Therapie auf Lamivudin umgestellt, weitere 6 erhielten nach anfänglicher Lamivudin-Therapie zusätzlich Adefovir. 5 Patienten hatten vor der Behandlung mit Lamivudin und anschließend Adefovir bereits eine Therapie mit IFN-alpha erhalten (Tabelle 6).

In 25 Fällen konnte die genaue Therapiedauer mit Lamivudin ermittelt werden, die sich im Durchschnitt auf 16,8 Monate belief. Der Median lag dabei bei 12 Monaten bei einer Spannweite von 1 bis 45 Monaten. Bei den verbliebenen 41 Patienten konnte nur der Zeitpunkt des Therapiebeginns bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Auswertung entweder die Lamivudin-Therapie noch lief oder die Behandlung seitens des Patienten nicht an der Universitätsklinik Würzburg fortgeführt wurde.

Beim Vergleich der beiden Genotyp-Kollektive A und D konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der durchschnittlichen Behandlungsdauer gefunden werden (Tabelle 7).

Tabelle 6: Demographische, virologische und klinische Daten der 66 Patienten, unterteilt nach Genotypen.

	Total	Genotyp A	Genotyp B	Genotyp C	Genotyp D	kein Genotyp
Fallzahl n (%)	66	17 (27,4 %)	1 (1,6 %)	4 (6,5 %)	40 (64,5 %)	4
Geschlecht (m/w)	52/14	15/2	0/1	3/1	32/8	2/2
<i>Alter in Jahren</i>						
Mittelwert±SD	45,3±13,3	50±13,4	28	38,3±9,1	43,9±12,8	48,7±13,2
Median (Spannweite)	43 (22-74)	50 (23-73)		37 (30-48)	43 (22-74)	45 (31-73)
<i>Altersverteilung</i>						
<30 Jahre	4 (6,4 %)	1 (5,9 %)	1 (100 %)	0	2 (5 %)	0
30-45 Jahre	30 (48,4 %)	6 (35,3 %)	0	3 (75 %)	21 (52,5 %)	2 (50 %)
46-60 Jahre	20 (32,3 %)	6 (35,3 %)	0	1 (25 %)	13 (32,5 %)	1 (25 %)
>60 Jahre	8 (12,9 %)	4 (23,5 %)	0	0	4 (10 %)	1 (25 %)
<i>Viruslast in Kopien/ml</i>						
Median (Spannweite)	7,0x10 ⁷ (3,0x10 ⁴ – 5,2x10 ⁹)	2,0x10 ⁸ (3,0x10 ⁴ – 2,0x10 ⁹)	2,0x10 ⁸	8,7x10 ⁷ (5,0x10 ⁷ – 3,0x10 ⁹)	6,0x10 ⁷ (5,9x10 ⁴ – 5,2x10 ⁹)	8,6x10 ³ (7,2x10 ³ – 1,0x10 ⁴)
<i>Therapieschema</i>						
nur Lamivudin	32 (48,5 %)	9 (52,9 %)	0	3 (75 %)	18 (45 %)	2 (50 %)
1. IFN 2. Lamivudin	23 (34,8 %)	5 (29,4 %)	1 (100 %)	1 (25 %)	14 (35 %)	2 (50 %)
1. Lamivudin 2. Adefovir	6 (9,1 %)	2 (11,8 %)	0	0	4 (10 %)	0
1. IFN 2. Lamivudin 3. Adefovir	5 (7,6 %)	1 (5,9 %)	0	0	4 (10 %)	0

Tabelle 7: Behandlungsdauer mit Lamivudin in Abhängigkeit von Genotyp A und D.

Genotyp	Fallzahl n	Lamivudin-Therapie in Monaten, Median (Spannweite)
A	4	23 (12 – 33)
D	21	12 (1 – 45)

4 Diskussion

Die Klassifikation unterschiedlicher HBV-Genotypen beruht auf einer Nukleotidvariation von mindestens 8% bezogen auf das Gesamtgenom. Dabei kann die Anzahl der Variationen je nach Genomabschnitt stark schwanken. Obwohl man nur mit der vollständigen Genomsequenzierung in der Lage ist, Rekombinanten zu identifizieren, gelingt die Genotypbestimmung auch bereits mit einem Teilabschnitt des Genoms (Bartholomeusz and Schaefer, 2004). In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Genotyps eine partielle rt-Region des HBV-Polymerase-Gens sequenziert. Diese Methode liefert zuverlässige Ergebnisse und wurde bereits in früheren Arbeiten verwendet, so z.B. in einer Studie aus Spanien, bei der ein Fragment der S-Region untersucht wurde (Echevarria, Avellon, and Magnius, 2005). Weltweit sind zur Zeit acht verschiedene HBV-Genotypen bekannt, die eine charakteristische regionale Verteilung aufweisen. In vielen Ländern, vor allem auch im europäischen Raum, sind bereits Studien durchgeführt worden, die die HBV-Genotypverteilung in dem jeweiligen Land untersucht haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Genotypen A und D in Europa am häufigsten vertreten sind, wobei Genotyp A vor allem in Nordwesteuropa, Genotyp D dagegen im Mittelmeerraum bzw. Südosteuropa zu finden ist. In Tabelle 8 sind die Daten einiger ausgewählter Studien zusammengefasst.

Die Auswahl der untersuchten Patientenkollektive zeigte im Vergleich einige Unterschiede. So wurden in Spanien HBsAg-Träger untersucht, die als Einschlusskriterium lediglich positive HBV-DNA aufweisen mussten (Echevarria, Avellon, and Magnius, 2005). In Polen wurden neben chronisch HBV-Infizierten auch Patienten mit akuter HBV eingeschlossen (Bielawski et al., 2004). In der Türkei, Frankreich und Belgien wurden nur chronische HBV-Träger auf den Genotyp untersucht (Cacoub et al., 2005; Micalessi, De Cock, and Vranckx, 2005; Serin et al., 2005; Sunbul and Leblebicioglu, 2005). Dabei legten Serin et al. ähnliche Einschlusskriterien wie in der vorliegenden Arbeit zugrunde, indem lediglich Patienten einbezogen wurden, die bei einer chronischen HBV-Infektion eine antivirale Therapie erhalten hatten (Serin et al., 2005).

Es zeigte sich, dass in all diesen Studien die Genotypen A und D vorherrschend waren. In Polen beispielsweise konnten 94,8 % diesen Genotypen zugeordnet werden

Tabelle 8: HBV-Genotypverteilung europäischer Länder.

Land	Einschlusskriterien	Total n	Genotypverteilung										
			A	B	C	D	E	F	G	mixed			
Deutschland (diese Studie)	HbsAg + HBV-DNA pos. + antivirale Therapie	62	17 (27,4%)	1 (1,6%)	4 (6,5%)	40 (64,5%)							
Spanien (<i>Echevarria</i>)	HbsAg + HBV-DNA pos.	266	66 (24,8%)	2 (0,7%)	6 (2,3%)	175 (65,8%)	10 (3,8%)	5 (1,9%)				2 (0,7%)	
Polen (<i>Bielawski</i>)	chron. HBV-Infektion akute HBV-Infektion	58	43 (74,1%)			12 (20,7%)		3 (5,2%)					
Tschech. Rep. (<i>Krekulova</i>)	HbsAg pos.	48	35 (73%)			13 (27%)							
Belgien (<i>Micalessi</i>)	HBV-DNA pos.	92	49 (53%)	1 (1%)		34 (37%)		1 (1%)				7 (8%)	
		34	19 (54%)			11 (31%)		1 (3%)				3 (9%)	
Frankreich (<i>Cacoub</i>)	HBsAg pos. > 6 Monate	185	44 (24%)	8 (4%)	20 (11%)	53 (29%)	19 (10%)	1 (1%)			3 (2%)	37 (20%)	
Niederlande (<i>Koppelman</i>)	HBV-DNA pos.	63	21 (33,3%)	7 (11,1%)	3 (4,8%)	31 (49,2%)		1 (1,6%)					
Türkei (<i>Serin</i>)	HbsAg + HBV-DNA pos. + antivirale Therapie > 1 Jahr	50				50 (100%)							
Türkei (<i>Sunbul</i>)	HbsAg pos. > 6 Monate; HBeAg/anti-HBe + HBV-DNA pos.; Transaminasen (>1,5 x Norm) > 6 Monate; chron. aktive Hepatitis in der Biopsie.	88				88 (100%)							

(Bielawski et al., 2004), in Frankreich waren es 53 % (Cacoub et al., 2005). Insgesamt waren bei diesen Studien durchschnittlich 88,4 % der Patienten mit Genotyp A oder D infiziert. Dabei war der Anteil an Genotyp D in Spanien, Frankreich und den Niederlanden am höchsten (Cacoub et al., 2005; Echevarria, Avellon, and Magnius, 2005; Koppelman and Zaaijer, 2004). In Polen, der Tschechischen Republik und Belgien konnten die meisten Patienten dem Genotyp A zugeordnet werden (Bielawski et al., 2004; Krekulova et al., 2004; Micales, De Cock, and Vranckx, 2005). In der Türkei wurde ausschließlich Genotyp D gefunden (Serin et al., 2005; Sunbul and Leblebicioglu, 2005). In Spanien, Frankreich und den Niederlanden ließen sich auch relativ hohe Anteile an Genotypen nachweisen, die primär eher selten in Mitteleuropa vorkommen, insbesondere die Typen B, C, E und F. Auch in Belgien konnte jeweils ein Patient mit Genotyp B, E und F identifiziert werden. Daten zu Herkunftsländern bzw. Migrationsbewegungen wurden in diesen Untersuchungen nicht erfasst.

In der vorliegenden Studie wurden 66 Patienten untersucht, die wegen einer chronischen HBV-Infektion mit Nukleosid- und/oder Nukleotidanaloga behandelt wurden. Von 62 Proben konnte der Genotyp ermittelt werden. In 4 Fällen gelang die Amplifikation des Polymeraseabschnittes für die Genotypisierung nicht. Ursache dafür könnte möglicherweise eine Inhibition der PCR durch das Probenmaterial oder eine Inkompatibilität zwischen den Primern und den HBV-Sequenzen der 4 Patienten gewesen sein.

Es zeigte sich, dass 91,9 % der bestimmten HBV-Genotypen den Typen A und D zuzuordnen waren (27,4 % für Genotyp A und 64,5 % für Genotyp D). Die Genotypen B und C konnten bei 1 (1,6 %) bzw. 4 (6,5 %) Patienten nachgewiesen werden. Die Genotypen E, F, G und H wurden im Rahmen dieser Studie nicht gefunden.

In dem Kollektiv, bei dem das Herkunftsland erfasst wurde (insgesamt 21 Patienten), zeigte sich, dass bei Patienten mit Genotyp A Deutschland als Herkunftsland signifikant häufiger vertreten war als bei Patienten mit Genotyp D ($P=0,0036$). Dies ist in Anbetracht der geographischen Verteilung der HBV-Genotypen für ein mitteleuropäisches Land wie Deutschland zu erwarten. Für das Auftreten eines relativ hohen Genotyp D-Anteils sowie weiterer Genotypen gibt es daneben einige Gründe: Durch zunehmende Immigration wird das Auftreten verschiedener Genotypen begünstigt, sei es durch Zuwanderung aus dem Mittelmeerraum wie beispielsweise aus der Türkei und dem ehemaligen Jugoslawien (Genotyp D) oder aus

südostasiatischen Ländern (Genotypen B und C). Dies zeigt sich auch in der vorliegenden Studie, bei der die Genotyp D-Infizierten aus verschiedenen europäischen bzw. asiatischen Ländern stammten, i.e. Türkei, Griechenland, Pakistan, Rumänien, Russland und Serbien. In diesen Ländern ist der Genotyp D vorherrschend. Ein Genotyp C-infizierter Patient stammte aus Kasachstan. Bei dem einzigen Genotyp B-Infizierten konnte allerdings weder die ethnische Zugehörigkeit bzw. die Herkunft des Patienten noch der Ort der Infektion ermittelt werden.

Abgesehen von Migrationsbewegungen haben bestimmte Verhaltensmuster möglicherweise einen Einfluss auf das Vorliegen von bestimmten HBV-Genotypen, die in bestimmten Regionen auftreten. Beispielsweise könnte eine weitere Erklärung für den mit 64,5 % hohen Anteil von Genotyp D-Infizierten darin liegen, dass dieser Genotyp unter i.v.-Drogenabhängigen weltweit die höchste Prävalenz aufweist (Bielawski et al., 2004). Angaben zum Infektionsrisiko der untersuchten Patienten lagen in dieser Studie allerdings nicht vor, sodass diese Überlegung nicht verifiziert werden konnte.

Zudem liefern auch die Einschlusskriterien dieser Arbeit eine Erklärung dafür, dass der Genotyp D häufiger als der Genotyp A gefunden wurde. In dieser Studie wurde ein Kollektiv behandlungsbedürftiger chronisch HBV-Infizierter untersucht, die eine Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga erhalten hatten. Da Patienten mit Genotyp A häufig besser auf IFN-alpha ansprechen und damit das Therapieziel erreichen (HBeAg/Anti-HBe-Serokonversion mit einhergehendem Rückgang der Entzündung und Viruslast), sodass eine Weiterführung bzw. Umstellung auf Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga nicht erforderlich ist, wurden diese Patienten schon à priori nicht in dieser Arbeit erfasst. Darüber hinaus bedürfen nicht alle HBV-Infizierten einer Therapie, sodass auch dadurch eine Selektion für diese Studie stattgefunden hat.

Somit zeigt das Vorkommen der Genotypen A, B, C und D in der vorliegenden Studie eine Verteilung, wie es für ein mitteleuropäisches Land zwar nicht typisch ist, die allerdings mit dem selektierten Patientenkollektiv und mit der Tatsache vereinbar ist, dass eine Vielzahl der untersuchten Patienten einen Migrationshintergrund aufweisen. Dennoch handelt es sich bei 62 genotypisierten Proben um ein relativ kleines Kollektiv, das keine grundsätzlichen Aussagen zur HBV-Genotypverteilung in Deutschland zulässt. Bezüglich der Korrelation zwischen HBV-Genotyp und Patientenalter, Geschlecht, laborchemischen Parametern und Viruslast ergaben sich

keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den Ergebnissen von Cacoub et al., der in seiner Studie mit 190 Patienten keine Beziehung zwischen HBV-Genotyp und demographischen Charakteristika, Risikofaktoren und laborchemischen Parametern nachweisen konnte (Cacoub et al., 2005).

Im Vergleich zwischen HBV-Genotyp A und D weisen Genotyp D-Infizierte eine geringere Ansprechrate auf Interferon alpha auf als Genotyp A-Infizierte (Schaefer, 2005). Palumbo beschreibt, dass dem gegenüber bei der Behandlung mit dem Nukleosidanalogen Lamivudin Genotyp A-Infizierte ein höheres Risiko aufweisen, eine Resistenzmutation (YMDD-Mutation) zu entwickeln als Genotyp D-Infizierte (Palumbo, 2007). Zollner et al. erkannte, dass initial dieses Risiko bei Genotyp A im Vergleich zu Genotyp D bis zu 20-fach erhöht ist (Zollner et al., 2002). Langzeitstudien ergaben jedoch, dass das Risiko von YMDD-Mutationen während des ersten Behandlungsjahres bei Genotyp A-Infizierten zwar leicht erhöht war, im zweiten oder dritten Behandlungsjahr aber der Anteil an diesen Mutationen ungeachtet des Genotyps gleichartig ausfiel. Dies legte die Vermutung nahe, dass es lediglich länger dauert, bis sich YMDD-Mutationen in Genotyp D-Infizierten manifestieren. Insgesamt wurde aber damit gezeigt, dass der HBV-Genotyp keine Rolle für ein erhöhtes Risiko von YMDD-Mutationen nach über einem Jahr Lamivudin-Therapie zu spielen scheint (Schaefer, 2005). Bei den Genotypen B und C wurde kein Unterschied in Bezug auf das Risiko einer YMDD-Mutation gefunden. Für die übrigen Genotypen E bis H liegen bislang keine Studien vor (Palumbo, 2007). Westland et al. konnte zeigen, dass die Ansprechrate auf das Nukleotidanalogen Adefovir-Dipivoxil ungeachtet des HBV-Genotyps keine signifikanten Unterschiede aufweist (Westland et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Daten zu Lamivudin-assoziierten Resistenzmutationen erfasst, sodass ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Genotypen nicht belegt werden konnte. Für eine allgemeine Beweisführung bezüglich Korrelation zwischen Genotyp und klinischen sowie epidemiologischen Charakteristika unter HBV-Infizierten wird es weiterer Studien bedürfen, ebenso zur Beurteilung, ob die Bestimmung des HBV-Genotyps hilfreich sein kann, das antivirale Therapieregime bei chronisch HBV-Infizierten gezielt zu planen und anzupassen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte eine Aussage zur HBV-Genotypverteilung bei den Patienten der Infektionsambulanz an der Universitätsklinik Würzburg getroffen werden. Untersucht wurden insgesamt 66 Patienten, die in dem Zeitraum vom 01.01.1997 bis zum 15.11.2004 aufgrund einer chronischen HBV-Infektion mit Nukleosid- und/oder Nukleotidanaloga behandelt wurden. HBV-Patienten, die lediglich IFN-alpha erhalten hatten, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. In 62 Fällen konnte ein ausreichendes PCR-Produkt zur Genotypisierung erzielt werden.

Von den acht bekannten HBV-Genotypen sind die Genotypen A und D in Europa vorherrschend, Genotyp A in Nordwesteuropa, Genotyp D im Mittelmeerraum und in Südosteuropa. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Studie, bei der von 62 genotypisierten Proben 91,9 % diesen beiden Genotypen zugeordnet werden konnten. Genotyp D war mit 64,5 % (40 Patienten) vorherrschend. Es folgten der Genotyp A (17 Patienten) und der Genotyp C (4 Patienten). In einem Fall wurde Genotyp B nachgewiesen. Deutschland als Herkunftsland war bei Patienten mit Genotyp A signifikant häufiger vertreten als bei Patienten mit Genotyp D. Der relativ hohe Genotyp D-Anteil ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch zunehmende Immigration das Auftreten verschiedener Genotypen beispielsweise aus dem südosteuropäischen Raum begünstigt wird. Patienten mit Genotyp A sprechen häufig besser auf IFN-alpha an, so dass eine Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga nicht erforderlich ist. Diese Patienten wurden somit à priori nicht in dieser Studie erfasst, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Genotyp A-Anteil mit 27,4 % relativ gering ausfiel.

Bei der Untersuchung von statistischen Zusammenhängen zwischen HBV-Genotyp und Patientenalter, Geschlecht, Viruslast und Therapiedauer ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

Diese Studie bietet Basisinformationen zur Genotypverteilung in Deutschland. Bezüglich einer Korrelation zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen und demographischen, virologischen sowie klinischen Charakteristika wird es künftig weiterer Studien bedürfen.

6 Literaturverzeichnis

- Bartholomeusz, A., and Schaefer, S. (2004). Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* **14**(1), 3-16.
- Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**(8256), 1129-33.
- Bielawski, K. P., Charmuszko, U., Dybikowska, A., Stalke, P., and Podhajska, A. J. (2006). Genetic variability of hepatitis B virus isolates in Poland. *Virus Genes* **33**(1), 77-86.
- Bielawski, K. P., Dybikowska, A., Lisowska-Charmuszko, U., Stalke, P., Gregorowicz, K., Trocha, H., and Podhajska, A. (2004). Distribution of HBV genotypes and mutants among hepatitis B infected patients from northern Poland. *Int J Mol Med* **14**(2), 301-4.
- Cacoub, P., Saadoun, D., Bourliere, M., Khiri, H., Martineau, A., Benhamou, Y., Varastet, M., Pol, S., Thibault, V., Rotily, M., and Halfon, P. (2005). Hepatitis B virus genotypes and extrahepatic manifestations. *J Hepatol* **43**(5), 764-70.
- Chin, R., and Locarnini, S. (2003). Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* **13**(4), 255-72.
- Clarke, B., and Bloor, S. (2002). Molecular genotyping of hepatitis B virus. *J Clin Virol* **25 Suppl 3**, S41-5.
- Cornberg, M., Protzer, U., Dollinger, M. M., Petersen, J., Wedemeyer, H., Berg, T., Jilg, W., Erhardt, A., Wirth, S., Schirmacher, P., Fleig, W. E., and Manns, M. P. (2007). Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection. *Z Gastroenterol* **45**(12), 1281-328.
- Custer, B., Sullivan, S. D., Hazlet, T. K., Iloeje, U., Veenstra, D. L., and Kowdley, K. V. (2004). Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* **38**(10 Suppl 3), S158-68.
- Echevarria, J. M., Avellon, A., and Magnius, L. O. (2005). Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol* **76**(2), 176-84.
- Ganem, D., and Prince, A. M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**(11), 1118-29.

- Hussain, M., and Lok, A. S. (1999). Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene associated with antiviral treatment for hepatitis B. *J Viral Hepat* **6**(3), 183-94.
- Kao, J. H. (2002). Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* **17**(6), 643-50.
- Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y., and Kidd, A. H. (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* **83**(Pt 6), 1267-80.
- Koppelman, M. H., and Zaaijer, H. L. (2004). Diversity and origin of hepatitis B virus in Dutch blood donors. *J Med Virol* **73**(1), 29-32.
- Krekulova, L., Rehak, V., Killoran, P., Zavoral, M., and Riley, L. W. (2004). [Distribution of HBV genotypes in the Czech population--pilot study]. *Vnitr Lek* **50**(2), 106-11.
- Lai, C. L., Ratziu, V., Yuen, M. F., and Poynard, T. (2003). Viral hepatitis B. *Lancet* **362**(9401), 2089-94.
- Manns, M. P., Caselmann, W. H., Wiedmann, K. H., and Wedemeyer, H. (2004). [Standard treatment of chronic hepatitis B]. *Z Gastroenterol* **42**(8), 687-91.
- Micalessi, M. I., De Cock, L., and Vranckx, R. (2005). Hepatitis B virus (HBV) genotyping in Belgian patients with chronic HBV infection. *Clin Microbiol Infect* **11**(6), 499-501.
- Miyakawa, Y., and Mizokami, M. (2003). Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* **46**(6), 329-38.
- Niederrau, C. (2007). [New German and American guidelines for therapy of hepatitis B. Discrepancies and similarities]. *Med Klin (Munich)* **102**(9), 763-7.
- Niesters, H. G., Pas, S., and de Man, R. A. (2005). Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status. *J Clin Virol* **34** Suppl 1, S4-8.
- Norder, H., Courouce, A. M., and Magnius, L. O. (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* **198**(2), 489-503.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* **69** (Pt 10), 2575-83.

- Palumbo, E. (2007). Hepatitis B genotypes and response to antiviral therapy: a review. *Am J Ther* **14**(3), 306-9.
- Papatheodoridis, G. V., Dimou, E., and Papadimitropoulos, V. (2002). Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* **97**(7), 1618-28.
- Roggendorf, M., and Ross, S. (2004). [Definition and diagnosis of acute and chronic hepatitis B]. *Z Gastroenterol* **42**(8), 679-81.
- Schaefer, S. (2005). Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* **12**(2), 111-24.
- Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13**(1), 14-21.
- Serin, M. S., Akkiz, H., Abayli, B., Oksuz, M., Aslan, G., and Emekdas, G. (2005). Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* **53**(1), 57-60.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F., and Rossau, R. (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* **81**(Pt 1), 67-74.
- Sunbul, M., and Leblebicioglu, H. (2005). Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* **11**(13), 1976-80.
- Torresi, J. (2002). The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* **25**(2), 97-106.
- Vivekanandan, P., Abraham, P., Sridharan, G., Chandy, G., Daniel, D., Raghuraman, S., Daniel, H. D., and Subramaniam, T. (2004). Distribution of hepatitis B virus genotypes in blood donors and chronically infected patients in a tertiary care hospital in southern India. *Clin Infect Dis* **38**(9), e81-6.
- Westland, C., Delaney, W. t., Yang, H., Chen, S. S., Marcellin, P., Hadziyannis, S., Gish, R., Fry, J., Brosgart, C., Gibbs, C., Miller, M., and Xiong, S. (2003). Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* **125**(1), 107-16.
- Zollner, B., Petersen, J., Schafer, P., Schroter, M., Laufs, R., Sterneck, M., and Feucht, H. H. (2002). Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis* **34**(9), 1273-7.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Axel Rethwilm angefertigt.

Zunächst gilt mein aufrichtiger Dank Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm für die Vergabe des interessanten Themas sowie Herrn Prof. Dr. med. Hartwig Klinker für die Übernahme des Korreferates.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Benedikt Weißbrich für die konstruktive Betreuung bedanken sowie für die fortwährende Bereitschaft, diese Arbeit durch zahlreiche Ratschläge und wertvolle Hilfestellungen zu fördern.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virusdiagnostik des Instituts für Virologie und Immunbiologie danke ich für die theoretische und praktische Einweisung in wesentliche Arbeitstechniken sowie für die kollegiale Unterstützung.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht und mich jederzeit hilfreich unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Johannes Juling
Geburtsdatum: 04.08.1980
Geburtsort: Aachen
Wohnort: Adelheidstraße 18
65185 Wiesbaden

Ausbildung

1987 - 1991: Grundschule Bildchen, Aachen
1991 - 1995: Viktoriaschule, Aachen
1995 - 1998: Leibniz-Gymnasium, Bad Schwartau
1998 - 2000: Markgrafen-Gymnasium, Karlsruhe-Durlach
06/2000: Allgemeine Hochschulreife

09/2000 - 02/2001: Sciences économiques et de gestion (2 Semester)
an der Université Louis Pasteur, Strasbourg/ Frankreich

Medizinische Ausbildung

2001 - 2007: Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
03/2003: Ärztliche Vorprüfung
06/2007: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach neuer
Approbationsordnung

Praktisches Jahr

02/2006 - 06/2006: Livingstone Hospital, Port Elizabeth/ Südafrika (Chirurgie)
Akademisches Lehrkrankenhaus der University of Cape Town
06/2006 - 10/2006: Inselspital, Universitätsspital Bern/ Schweiz (Innere Medizin)
10/2006 - 01/2007: Institut für Röntgendiagnostik der Universität Würzburg
(Radiologie)

seit 01/2008: Assistenzarzt in der Praxisgemeinschaft für Radiologie,
Nuklearmedizin und Strahlentherapie (RNS) am St. Josefs-Hospital,
Wiesbaden

Würzburg, September 2009