

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# **GENOTYPISIERUNG UND RESISTENZBESTIMMUNG DES HEPATITIS-B-VIRUS DURCH PYROSEQUENZIERUNG**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**PAUL LESZEK ZIMMERMANN, geb. RYBARKIEWICZ**  
**aus Thorn**

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher, Institut für Infektionsmedizin

2. Berichterstatter: PD Dr. Monika Brüggemann, Med. Klinik II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 08.07.2010

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi



---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Hepatitis-B-Virus	1
1.3 Klinik einer HBV-Infektion	4
1.4 Prävention	6
1.5 Therapie	6
1.6 Resistenzmutationen	8
1.7 HBV-Genotypen	9
1.8 Zielsetzung der Arbeit	11
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Auswahl der Patientenproben	12
2.2 DNA-Extraktion	12
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	12
2.4 Detektion durch Agarosegelelektrophorese	16
2.5 Sanger-Sequenzierung	16
2.6 Pyrosequenzierung	18
2.7 Datenbankerstellung	21
2.8 Verwendete Geräte	22
2.9 Verwendete Chemikalien und Lösungen	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1 Datenbank	24
3.2 Optimierung der Anlagerungs-Temperatur	25
3.3 Optimierung der Pyrosequenzierung	27
3.4 Etablierung der Pyrosequenzierung	30
3.5 Ergebnisse für Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin	30
3.6 Ergebnisse für Patientenproben aus der Medizinischen Klinik	35
3.7 Ergebnisse für Patientenproben aus einem Ringversuch	39

	Seite
<b>4. Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1 Auswertung	41
4.2 Sequenzierstrategien im Vergleich	42
4.3 Klinische Relevanz	43
4.4 Ausblick	44
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>61</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>62</b>

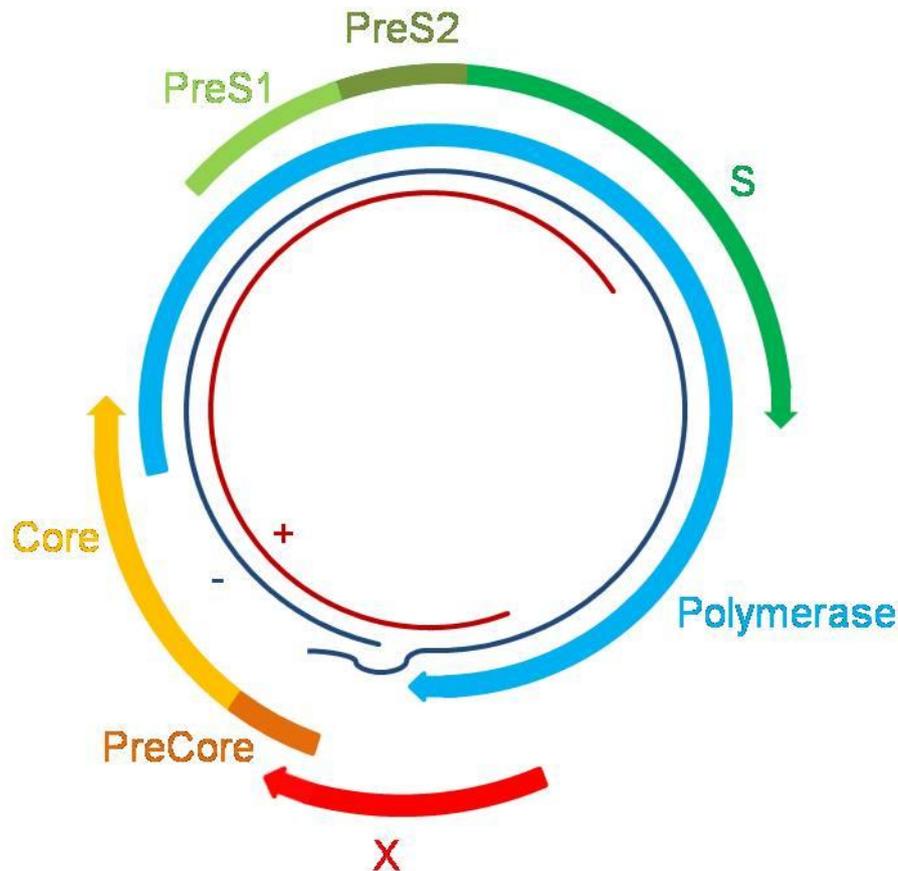
## **1. Einleitung**

### **1.1 Epidemiologie**

Weltweit sind 300 bis 420 Millionen Menschen chronisch-aktiv mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert (1). Als chronisch-aktiv werden HBsAg-Träger mit nachweisbarer Virus-DNA definiert. Die Prävalenz beträgt durchschnittlich 5-7%, ist aber je nach Region unterschiedlich hoch und kann in drei Zonen eingeteilt werden. In Asien und Afrika sind mehr als 8%, in Süd- und Ost-Europa, Nordafrika und dem mittleren Orient 2-7% und in Nordeuropa, Nordamerika und Australien weniger als 2% der Bevölkerung chronisch-aktiv mit HBV infiziert (2). In Deutschland sind laut Angaben des Epidemiologischen Bulletins des Robert Koch-Instituts 0,4-0,8% der Bevölkerung chronisch-aktiv mit HBV infiziert. Unter den Neuinfizierten sind hauptsächlich Männer in einem Alter von 25 bis 30 Jahren betroffen (3). Daraus ist zu schließen, dass die sexuelle Exposition den Hauptübertragungsweg des HBV in der Allgemeinbevölkerung darstellt. In Gebieten, in denen HBV endemisch ist, wird es hauptsächlich perinatal von der Mutter auf ihr Kind übertragen. Ein weiterer Übertragungsweg ist der Kontakt mit kontaminiertem Blut. Betroffen sind dabei vor allem Personen, die Drogenabusus betreiben oder, in geringerem Ausmaß, die chronisch hämodialysiert werden (4). Aufgrund der stringenten Voruntersuchungen spielen Bluttransfusionen bei der HBV-Übertragung in Deutschland keine wesentliche Rolle mehr. Ein Viertel bis ein Drittel der chronisch-aktiv mit HBV Infizierten entwickelt im Verlauf der Infektion eine fortgeschrittene Lebererkrankung. Weltweit werden 30% der Erkrankungen an Leberzirrhose und 53% der Erkrankungen an hepatozellulärem Karzinom dem HBV zugeschrieben (5). Jährlich versterben bis zu einer Million Menschen an diesen Folgeerkrankungen der HBV-Infektion (6).

### **1.2 Hepatitis-B-Virus**

HBV gehört zur Familie der Hepadnaviren (7). Es ist das kleinste humanpathogene DNA-Virus und streng hepatotrop. Die Viruspartikel (Virionen) sind 42 bis 47 nm groß und besitzen eine Lipidmembran-Hülle, in die Oberflächenproteine eingelagert sind (8, 9). Das Genom mit der assoziierten Polymerase wird von einem Nukleokapsid umgeben (10).



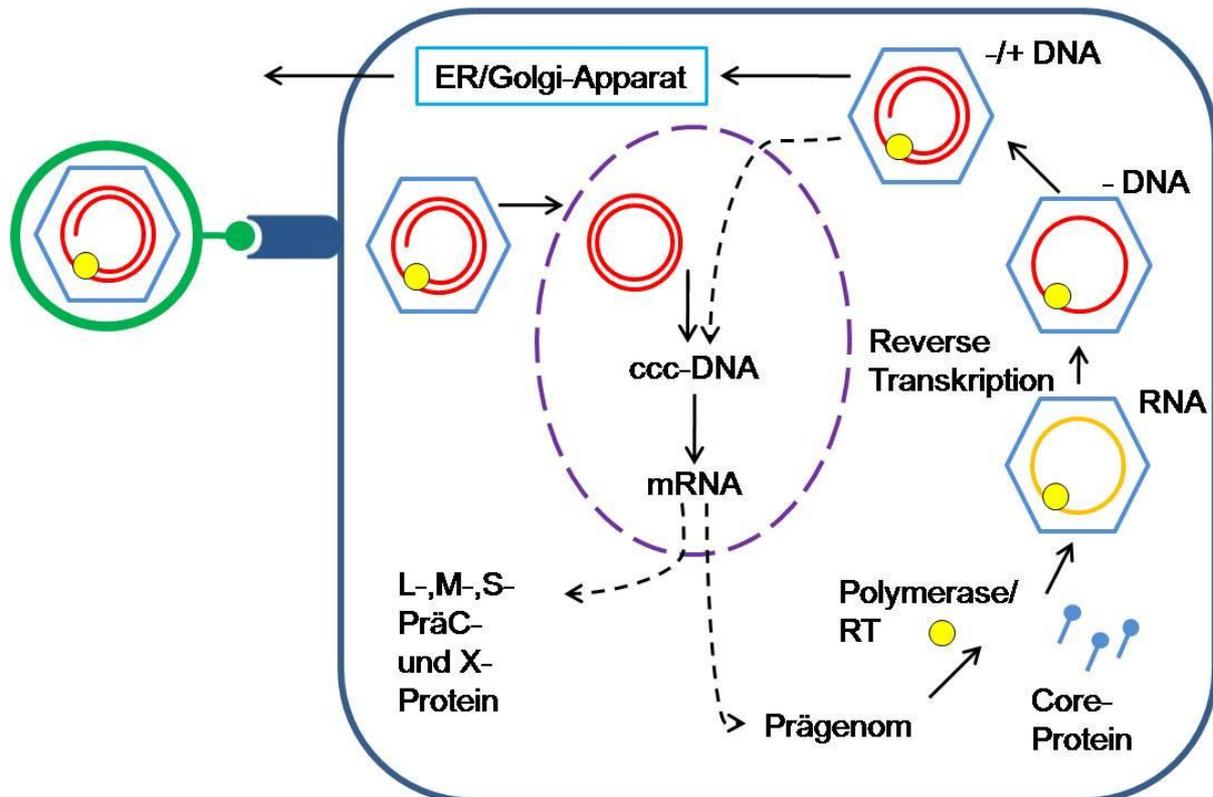
**Abb. 1.1. Genomorganisation des HBV.** Die vier offenen Leserahmen kodieren für die Polymerase (blau), die drei Varianten des HBs-Oberflächen-Glykoproteins (HBsAg, grün), das Core-Protein (HBc-Ag, gelb), das exkretorische HBV-Antigen (HBxAg, orange) und für das X-Protein (HBxAg, rot). Das partiell doppelsträngige DNA-Genom besitzt einen kompletten Minusstrang (-) und einen inkompletten Plusstrang (+).

Das DNA-Genom von HBV (Abb. 1.1) umfasst ungefähr 3,2 kb, ist zirkulär und partiell doppelsträngig angeordnet. Der Minusstrang trägt die komplette genetische Information. Der komplementäre Plusstrang liegt im Virion unvollständig vor und umfasst nur 20 bis 80% des Genoms (10, 11, 12). Das variable Ende wird damit begründet, dass der Plusstrang innerhalb des Nukleokapsids hergestellt wird, welches für Nukleotide undurchlässig ist. Somit ist die Länge des Plusstrangs von der Menge der eingeschlossenen Mononukleotide abhängig. Die zirkuläre Anordnung beruht auf der Basenpaarung zwischen Plus- und Minusstrang (13, 14). Auf dem Minusstrang befinden sich vier offene Leserahmen (ORF), die auch teilweise überlappen (15; Abb. 1.1). Der größte der vier Leserahmen kodiert für die virale Polymerase (16). Ein anderer Leserahmen enthält das Startcodon für die drei Oberflächen-Glykoproteine

(HBsAg), die zusammen mit Wirtszell-Lipiden die Hülle des Virus bilden (17). Ein weiterer Leserahmen kodiert für das Core-Protein (HBcAg), welches das Kapsid bildet (18), und für seine posttranslational verändertete Form, dem exkretorischen HBV-e-Antigen (HBeAg), das als Marker für die Aktivität der viralen Replikation genutzt wird (19). Der kleinste Leserahmen kodiert für das X-Protein (HBxAg), das eine Rolle bei Apoptose, maligner Transformation und Virusreplikation spielt (20).

Die Virusreplikation erfolgt nur in Hepatozyten (Abb. 1.2). Dazu muss das Virus vorher in den Hepatozyten aufgenommen werden. Zu diesem Zweck bindet das Virus an noch nicht definierte Rezeptoren auf der Zellmembran des Hepatozyten, wodurch es zu einer Fusion der Virushülle und der zellulären Membran kommt (21, 22, 23). Bei der Aufnahme wird die Virushülle entfernt. Die Virus-DNA ist dann nur noch vom Kapsid umgeben. Das Nukleokapsid wird zum Zellkern transportiert. Dort löst sich die Virus-DNA von den Kapsidproteinen und gelangt durch Kernporen in den Zellkern hinein (24).

Die partiell doppelsträngige Virus-DNA wird im Zellkern durch zelluläre DNA-Reparaturmechanismen vervollständigt und in eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (ccc-DNA) überführt (25, 26). Sie dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNAs, von denen die viralen Proteine abgelesen und das RNA-Prägenom synthetisiert werden. Zusammen mit dem viralen Core-Protein und der viralen Polymerase/Reversen Transkriptase wird das RNA-Prägenom in das Nukleokapsid eingebaut (27). Innerhalb des Nukleokapsids wird das RNA-Prägenom von der Reversen Transkriptase in das partiell doppelsträngige DNA-Genom zurück übersetzt. Zuerst wird der vollständige DNA-Minusstrang hergestellt, danach der inkomplette Plusstrang (28). Ein Teil der neu gebildeten Nukleokapside wird mit einer Hüllmembran umgeben und über den Golgi-Apparat freigesetzt. Ein anderer Teil wird zurück in den Zellkern transportiert und zur weiteren Virusreplikation verwendet (29, 30, 31).

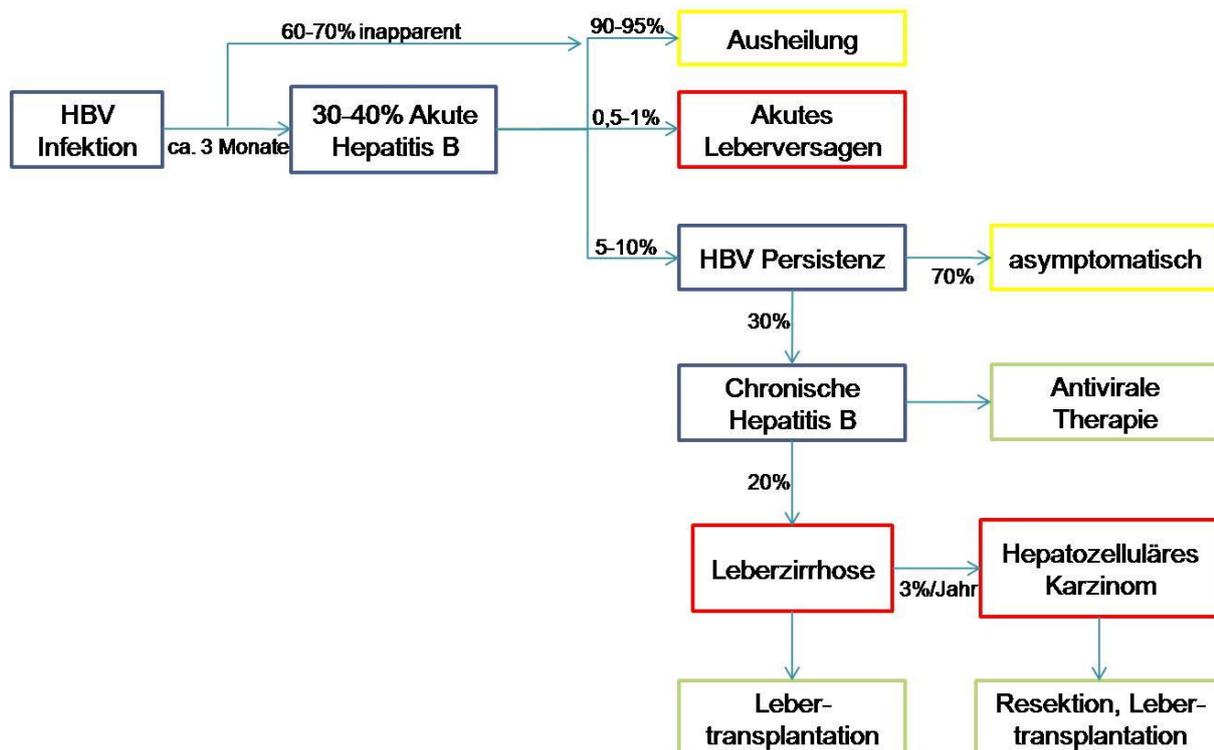


**Abb. 1.2. Replikationszyklus des HBV in Hepatozyten.** Schematische Darstellung nach Kayser *et al.* (Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie, 11 Auflage, Thieme 2005). Nach Aufnahme des Virus in den Hepatozyten erfolgt der Transport in den Zellkern. Die Virus-DNA wird in eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (ccc-DNA) überführt die als Matrice für die messenger-RNAs (mRNA) dient. Von den mRNAs werden die viralen Proteine (L-,M-,S-,PräC- und X-Protein) sowie das Prägenom synthetisiert. Das RNA-Prägenom (RNA) wird in das Nukleokapsid eingebaut und von der Reversen Transkriptase (RT) in das partiell doppelsträngige DNA-Genom (-/+ DNA) zurück übersetzt. Ein Teil der neu gebildeten Nukleokapside wird freigesetzt, ein anderer wird zurück in den Zellkern transportiert und zur weiteren Virusreplikation verwendet.

### 1.3 Klinik einer HBV-Infektion

Die HBV-Infektion ist durch unterschiedliche Phasen und Verlaufsformen gekennzeichnet (Abb. 1.3). Nach der Infektion hat HBV eine durchschnittliche Inkubationszeit von 35 bis 120 Tagen (32). Die akute HBV-Infektion ist klinisch stark variabel. In den meisten Fällen (60-70%) verläuft sie asymptomatisch. Bei 30 bis 40% der Patienten kommt es zu einem klinisch apparenten Verlauf, die als Leitsymptom häufig einen Skleren- und Hautikterus entwickeln. Desweiteren treten unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Appetitlosigkeit auf. Die Symptome werden hauptsächlich durch die antivirale Immunantwort des Organismus verursacht (33). Der weitere Verlauf ist von der Immunkompetenz des Patienten abhängig. Ist die zelluläre Immunantwort durch CD8-

positive, zytotoxische T-Zellen, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) imstande, die Virusreplikation einzudämmen, heilt die Infektion in 90 bis 95% der Fälle aus. In seltenen Fällen (0,5-1%) kommt es zu einer fulminanten Hepatitis, bei der bis zu 80% der Erkrankten in kürzester Zeit an einem akuten Leberversagen versterben. Bei lediglich 5 bis 10% der Infizierten im Erwachsenenalter geht die akute HBV-Infektion in eine chronisch-aktive Hepatitis B über, welche als Persistenz des Hepatitis-B-Surface-Antigens (HBsAg) im Serum für über mindestens sechs Monate definiert ist. Bei einer vertikalen Transmission von der Mutter auf das Kind kommt es in bis zu 90% der Fälle zu einer Persistenz der aktiven, HBsAg-positiven HBV-Infektion. Etwa 70% der HBsAg-Träger bleiben im Krankheitsverlauf asymptomatisch. Dagegen kommt es in 30% der Fälle zu einer symptomatischen Verlaufsform. Von diesen Patienten erkranken 20% an einer Leberzirrhose, die bei 3% pro Jahr in ein hepatozelluläres Karzinom übergeht.



**Abb. 1.3. Der klinische Verlauf einer HBV-Infektion.** Nach Infektion verläuft die akute HBV in den meisten Fällen inapparent. In 90 bis 95% der Fälle heilt die Infektion folgenlos aus. Chronische Verläufe führen nach Jahren zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom.

#### **1.4 Prävention**

Die Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut empfiehlt die Impfung von Säuglingen, Kindern und Jugendlichen bis zur Vollendung des 17. Lebensjahres. Des Weiteren sollen Personen, die definierten Risikogruppen angehören, geimpft werden. Zu diesen Risikogruppen gehören unter anderem Beschäftigte im Gesundheitswesen, Personen, die häufig Blutprodukte erhalten, bei denen größere chirurgische Eingriffe bevorstehen, oder Personen mit einer chronischen Lebererkrankung außer Hepatitis B (34). Die Impfung besteht aus dreimaliger Verabreichung von rekombinant hergestelltem HBsAg (Totimpfstoff). Damit ein ausreichender Impfschutz gewährleistet werden kann, sollte eine Auffrischung der Grundimmunisierung nach zehn Jahren durchgeführt werden. Bei Personen die einem hohen Hepatitis-B-Risiko ausgesetzt sind, sollte der Impferfolg durch die Kontrolle des Anti-HBs-Antikörpertiters überprüft werden. Ein Anti-HBs-Titer von 100 Internationalen Einheiten/l garantiert eine langjährige Immunität (35).

#### **1.5 Therapie**

Die akute Hepatitis B wird aufgrund der hohen Spontanheilungsrate von 90-95% nicht mit antiviralen Medikamenten behandelt. Eine Studie konnte keinen Vorteil bei einer antiviralen Therapie nachweisen (36). In mehreren Fallberichten konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine fulminante Hepatitis entwickelten, von einer frühzeitigen antiviralen Therapie profitierten (37, 38). Die Indikationsstellung für eine Therapie bei einer HBV-Infektion mit einem chronischen Verlauf basiert auf einer deutlichen, entzündlichen und replikativen Aktivität oder der Entwicklung einer Leberfibrose oder Leberzirrhose. Faktoren, die auf eine entzündliche und replikative Aktivität hinweisen, sind die fehlende HBe-Serokonversion, eine hohe Viruslast ( $>10^4$  Kopien/ml), hohe Transaminasen-Werte und entzündliche Veränderungen in der Leberhistologie. Das Ziel der antiviralen Therapie bei einer Hepatitis B ist die Verhinderung von Spätfolgen wie der Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms. Als Parameter für ein Ansprechen der Therapie gelten der schnelle Abfall der Viruslast (Kopienzahl der HBV-DNA pro ml Plasma), die dauerhafte HBe-Serokonversion (Verschwinden von HBeAg, Bildung von HBe-Antikörpern), eine dauerhafte Suppression der Virusreplikation, eine dauerhafte Normalisierung der Transaminasenwerte sowie

eine Reduktion der histologisch zu kontrollierenden entzündlichen Aktivität. Die antivirale Therapie wird mit Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), den Nukleosid-Analoga Lamivudin und Entecavir und dem Nukleotid-Analogen Adefovir-Dipivoxil durchgeführt. Die Medikamente können als Mono- oder als Kombinationstherapie verabreicht werden (39).

IFN- $\alpha$  kann von vielen menschlichen Zelltypen gebildet werden, wird aber hauptsächlich von Natürlichen Killer-Zellen, Monozyten und Makrophagen synthetisiert. Es besitzt antivirale und immunmodulierende Wirkung. Zur Therapie der Hepatitis B wird gentechnisch hergestelltes IFN- $\alpha$  verwendet (40), welches seit 1987 auf dem Markt ist. Neben der Therapie mit IFN- $\alpha$  steht seit 2002 auch pegyliertes IFN- $\alpha$  zur Verfügung. Dieses Protein wurde mit 40 kD Polyethylenglycol konjugiert, wodurch Pharmakokinetik und -dynamik verbessert werden konnten (41). Die Überlegenheit von pegyliertem IFN- $\alpha$  gegenüber Standardinterferonen zeigt sich bei der HBe-Serokonversion, Reduzierung der Viruslast sowie der Normalisierung der Transaminasenwerte (42).

Nukleosid- und Nukleotid-Analoga hemmen die virale DNA-Polymerase, die als Reverse Transkriptase von der RNA-Matrize ausgehend virale DNA herstellt. So kann bei der Virusreplikation das RNA-Prägenom nicht mehr in das partiell doppelsträngige DNA-Genom zurück übersetzt werden (43). Das Nukleosidanaloga Lamivudin war das erste antivirale Medikament seiner Art, das zur Behandlung der Hepatitis B zugelassen wurde. Es ist seit 1995 in Deutschland erhältlich. Bei einer Therapie mit Lamivudin kommt es häufig zur Entwicklung von Resistenzmutationen (Kapitel 1.6 Resistenzmutationen). Das Nukleotidanaloga Adefovir-Dipivoxil ist seit 2003 in Deutschland zugelassen. Das inaktive Prodrug wird erst im Gastrointestinaltrakt in die aktive Form Adefovir umgewandelt. Adefovir-Dipivoxil wird zur Initialtherapie, aber auch bei Patienten mit einer Lamivudin-Resistenz eingesetzt. Seit 2006 ist das Nukleosidanaloga Entecavir in Deutschland zugelassen. In ersten Studien konnte eine Überlegenheit gegenüber Lamivudin und Adefovir-Dipivoxil gezeigt werden (44, 45, 46). Entecavir eignet sich für Patienten mit Lamivudin- und Adefovir-resistentem HBV. Aufgrund der geringen Neigung zur Resistenzentwicklung kommt Entecavir als Standardmedikament für die Initialtherapie der Hepatitis B infrage. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Nukleosid- und Nukleotid-Analoga die dauerhafte HBe-Serokonversion, die Normalisierung der Transaminasen-Werte, die

Reduzierung der Viruslast und die Verbesserung der Leberhistologie induziert (48, 49, 50, 51, 52).

### **1.6 Resistenzmutationen**

Ein häufiger Grund für den Misserfolg einer antiviralen Therapie mit Nukleosid- und Nukleotid-Analoga ist die Entstehung viraler Resistenzmutationen. Bei vielen Patienten, die über einen längeren Zeitraum erfolgreich mit den antiviralen Medikamenten Lamivudin oder Adefovir-Dipivoxil behandelt wurden, kam es zu einem erneuten Anstieg der Viruslast, erhöhten Transaminasen-Werten und erneuten entzündlichen Veränderungen in der Leberhistologie (53). Studien belegen, dass bei einer Therapie mit Lamivudin nach einem Jahr ungefähr 24% und nach vier Jahren 70% der behandelten Patienten eine Resistenzmutation entwickeln (54). Ebenso ergaben Studien, dass nach einem Jahr 1-2% und nach vier Jahren ungefähr 18% der Patienten nach einer Behandlung mit Adefovir-Dipivoxil eine Resistenzmutation entwickeln (55). Im Gegensatz zu Lamivudin und Adefovir-Dipivoxil entwickeln bei einer Initialtherapie mit Entecavir nach fünf Jahren nur 0,8% der Patienten eine Resistenzmutation. Jedoch entwickeln 43% der mit Lamivudin vorbehandelten Patienten mit einer Lamivudin-Resistenzmutation eine Resistenzmutation gegen Entecavir (47).

Die Sequenzierung des HBV-Genoms von Patienten, bei denen die Behandlung mit Lamivudin versagte, zeigte HBV-Mutanten mit einer Mutation von Methionin zu Valin oder Isoleucin an der Position 204 (rtM204V/I) der Aminosäurekette im YMDD-Motiv (Tyrosin, Methionin, Asparaginsäure, Asparaginsäure) der HBV-DNA-Polymerase (56, 57, 58). Diese Mutation führt jedoch nicht nur zu einer Resistenz gegen Lamivudin, sondern auch zur Verringerung der Virusreplikation (59, 60). Neben der rtM204V/I-Mutation sind noch zwei Virus-Fitness-Mutationen bei der Lamivudin-Resistenz von Bedeutung. Die Mutation von Leucin zu Methionin an der Position 180 (rtL180M) tritt vermehrt zusammen mit der rtM204V/I Mutation auf (61). Sie führt zu einer verstärkten Resistenz gegen Lamivudin und zu einer kompensatorisch verbesserten Virusreplikation. Ebenso führt auch die Mutation von Valin zu Leucin an der Position 173 (rtV173L) zu einer kompensatorisch verstärkten Virusreplikation bei HBV-Mutanten mit der rtM204V/I Mutation (62).

Bei Patienten, bei denen eine Behandlung mit Adefovir-Dipivoxil versagte, zeigte die Sequenzierung des HBV-Genoms zwei Mutationen der HBV-DNA-Polymerase. Die erste Mutation ist Alanin zu Valin oder Threonin an der Position 181 (rtA181V/T), die zweite Mutation ist Asparagin zu Threonin an der Position 236 (rtN236T) (63, 64).

Bislang sind drei Mutationen der HBV-DNA-Polymerase bekannt, die zu einer Resistenz gegen Entecavir führen. Zu einer Entecavir-Resistenz kommt es jedoch nur bei gleichzeitigem Vorliegen der Lamivudin-Resistenz rtM204V/I und der Virus-Fitness-Mutation rtL180M (65). Einerseits ist es die Mutation von Threonin zu Glycin oder Serin an der Position 184 (rtT184/GS). Die zweite Mutation ist Serin zu Isoleucin an der Position 202 (rtS202/I). Die dritte Mutation ist Methionin zu Valin an der Position 250 (rtM250V) (66). Die Kenntnis der Mutationen ist eine Voraussetzung für eine optimale Therapieplanung oder für einen Therapiewechsel bei Verdacht auf ein fehlendes Ansprechen der bisherigen antiviralen Therapie.

### 1.7 HBV-Genotypen

Das HBV kann in acht Genotypen, A bis H, eingeteilt werden (67, 68, 69, 70). Die Genotypisierung erfolgt durch Analyse der kompletten HBV-DNA-Sequenz oder nur von Teilabschnitten. Ein neuer Genotyp muss in mindestens 8% der kompletten HBV-DNA-Sequenz Abweichungen aufzeigen (71).

Die einzelnen Genotypen verfügen über eine unterschiedliche weltweite Verteilung (Abb. 1.4). Genotyp A zeigt eine weite Ausbreitung in Nordwest-Europa, Nordamerika und Zentralafrika. Die Genotypen B und C dominieren in Südost-Asien, China und Japan. Das Verbreitungsgebiet des Genotyp D sind hauptsächlich die mediterranen Länder, der Mittlere Osten und Indien. Genotyp E findet sich insbesondere in West- und Zentralafrika. Der Genotyp F ist unter den amerikanischen Ureinwohnern, den Bewohnern Polynesiens und in Süd- und Mittelamerika stark verbreitet. Die Verbreitung der Genotypen G und H ist noch unklar. Der Genotyp G wurde bei Patienten in den Vereinigten Staaten von Amerika und Frankreich nachgewiesen. Der Genotyp H fand sich bei Patienten aus Nicaragua, Mexiko und Kalifornien (69, 70, 72, 73).

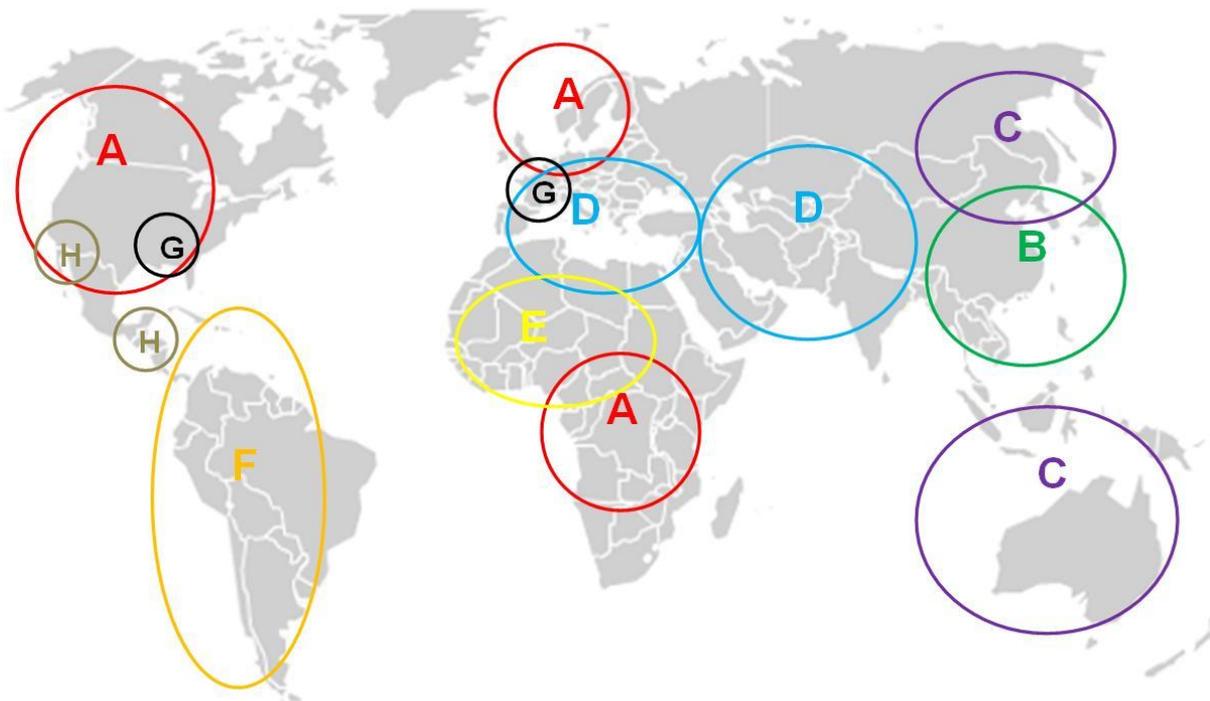


Abb. 1.4. Weltweite Verbreitung der HBV-Genotypen A-H.

Studien haben gezeigt, dass die einzelnen HBV-Genotypen eine unterschiedliche Pathogenität haben. In der Schweiz wurde bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B häufiger der Genotyp A und bei Patienten mit einer akuten Hepatitis B häufiger der Genotyp D gefunden. Somit zeigt der Genotyp A häufiger einen chronischen Verlauf als der Genotyp D (74). Ebenso traten bei einer antiviralen Therapie mit Lamivudin häufiger Resistenzen bei Patienten mit Genotyp A als mit Genotyp D auf (75, 76). Bei der Therapie mit IFN- $\alpha$  wurde nachgewiesen, dass der Genotyp A höhere Ansprechraten hat als der Genotyp D (77). Forschungsgruppen aus Asien belegten, dass der Genotyp B im Vergleich mit dem Genotyp C eine früher einsetzende HBe-Serokonversion aufweist (78, 79). Ebenso wurde berichtet, dass Patienten mit Genotyp B seltener eine Leberfunktionsstörung und eine Leberzirrhose als Patienten mit Genotyp C entwickeln und auch besser auf eine antivirale Therapie mit IFN- $\alpha$  ansprechen (80, 81). Weitere Studien zeigten, dass der Genotyp C ein höheres Risiko für die Entwicklung und Metastasierung eines hepatozellulären Karzinoms besitzt (82, 83). Somit kann man bei Kenntnis des Genotyps den Verlauf der Erkrankung besser vorhersagen und die antivirale Therapie besser planen, z.B.

indem man bei bestimmten Genotypen (Genotyp C und D) von einer Therapie mit IFN- $\alpha$  absieht.

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Wie bisher aufgeführt kann eine adäquate, antivirale Therapie von chronisch-aktiven HBV-Patienten die Spätfolgen wie Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom reduzieren. Dabei ist die Kenntnis des Genotyps und eventuell vorhandener Resistenzmutationen nützlich. Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Routinediagnostik-Methode für die gleichzeitige Genotypisierung und Resistenzbestimmung von HBV zu etablieren. Dabei sollte die Technik einerseits kostengünstiger aber auch schneller als die Sanger-Sequenzierung sein. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Pyrosequenzierung gewählt. Diese ermöglicht die Sequenzierung von kurzen Sequenzabschnitten (bis 100 bp) in Echtzeit und kann Polymorphismen bis 10% noch auflösen. Die neue Methode sollte an insgesamt 53 Patientenproben validiert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Auswahl der Patientenproben**

Zur Validierung der Methode wurden Patientenproben mit unbekanntem Genotyp und Resistenzmutationen aus drei verschiedenen Einrichtungen untersucht. Aus dem Institut für Infektionsmedizin stammten 26 Proben. Es handelte sich um bei -20°C gelagerte Proben mit einer bekannten Viruslast (> 100 U/ml). Weitere Proben (N=30) wurden von Oberarzt Dr. med. Rainer Günther aus der Medizinischen Klinik I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Von diesen konnten Sequenzen nur von 20 Proben ermittelt werden, da nur diese eine ausreichende Viruslast (> 100 U/ml) aufwiesen. Zur weiteren Überprüfung der Methode wurden acht Proben aus einem Ringversuch (Quality Control on Molecular Diagnostics, QCMD, Glasgow) verwendet, wovon sieben Proben eine ausreichende Viruslast (>100 U/ml) hatten. Insgesamt wurde DNA aus 53 Patientenproben extrahiert, amplifiziert und sequenziert.

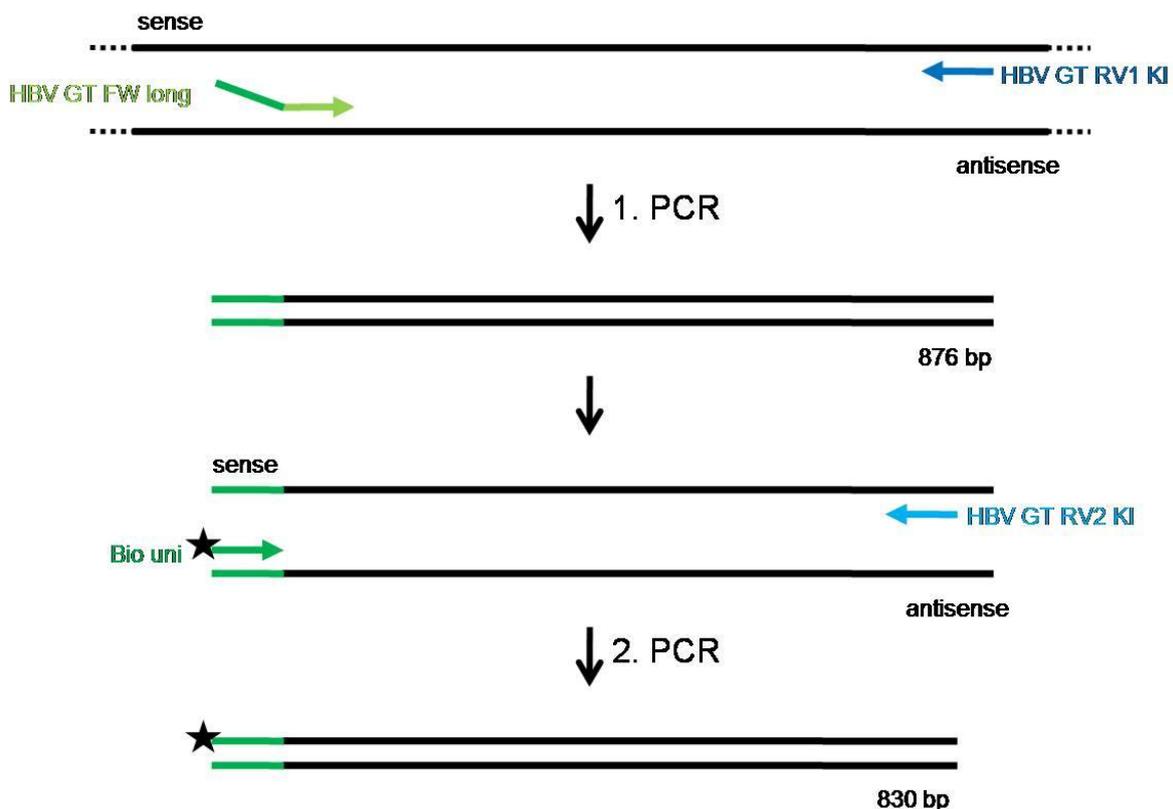
### **2.2 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp-DNA-Mini-Kit aus jeweils 200 µl Patientenserum. Die DNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Prinzip beruht darauf, dass die DNA während eines kurzen Zentrifugationsschrittes an eine Silicagel-Membran gebunden wird. Anschließend wird sie durch mehrere Waschschriffe von Proteinen und anderen Kontaminationen gereinigt und letztendlich in einer Pufferlösung eluiert. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.3 Polymerase-Kettenreaktion**

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Abschnitte gezielt vervielfältigt werden (84). Der PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA (Matrize) bei ca. 95°C denaturiert. Es kommt zur Auftrennung der beiden Stränge. Im zweiten Schritt (Anlagerung) binden zwei spezifische Oligonukleotide (Primer) bei einer Temperatur von ca. 50-70°C an die einzelsträngige DNA in Sinn- und Gegensinn-Orientierung (sense und antisense).

Die Anlagerungs-Temperatur ist abhängig von der Sequenz und der Länge der verwendeten Primer. Durch den spezifischen Aufbau der Primer werden die Startpositionen der Reaktion und somit die Länge der zu gewinnenden DNA-Abschnitte bestimmt. Im letzten Schritt werden bei 72°C die Oligonukleotide durch den Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) durch eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Am Ende liegen wieder alle DNA-Abschnitte doppelsträngig vor und dienen als Matrizen für den nächsten Reaktionszyklus. Diese Reaktionsabfolge wird im Thermocycler 30-50 Mal wiederholt.



**Abb. 2.1. Prinzip der semi-Nested-PCR.** Der Stern am Bio uni-Primer steht für das Biotin-Konjugat.

Zur Vervielfältigung der DNA wurde eine *semi-Nested-PCR* verwendet (Abb. 2.1). Hierbei handelt es sich um zwei nacheinander folgende PCRs. Die erste PCR erfolgt mit zwei einfachen Primern (sense und antisense), wobei der sense-Primer (vorwärts gerichtet, forward) als Verlängerung die Bindungsstelle für den sense-Primer der zweiten PCR enthält. Bei der zweiten PCR wird ein Primer (sense, forward) verwendet, der innerhalb der in der Sequenz des sense Primers der ersten PCR bindet. Als

zweiter Primer (antisense; rückwärts gerichtet, revers) wird ein Primer verwendet, der eingerückt im ersten PCR-Produkt bindet.

Der amplifizierte DNA-Abschnitt umfasst ca. 800 bp und befindet sich im Gen für die HBV-DNA-Polymerase. Innerhalb dieses DNA-Abschnitts befinden sich die Positionen der aktuell bekannten Resistenzmutationen sowie Bereiche, die Genotyp-spezifische Polymorphismen aufweisen und so zur Genotypisierung genutzt werden können. Die für die semi-*Nested*-PCR verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1. PCR-Primer

Primer-Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'-3'
<i>1. PCR</i>	
HBV GT FW long	GGG CCG GGG CCG GGT TTC TCA TCT TCT TRT TGG TTC TTC TGG A
HBV GT RV1 KI	AGG AGT TCC GCA GTA TGG ATC GG
<i>2. PCR</i>	
Bio Uni	Biotin-GGG CCG GGG CCG GGT TT
HBV GT RV2 KI	AAG CCC CAR CCA GTG GGG GTT GCR TCA GC

Damit die beiden Stränge zum späteren Zeitpunkt getrennt werden können, wurde der Forward-Primer der zweiten PCR mit Biotin versehen.

Die Optimierung der Anlagerungs-Temperatur erfolgte mit einem Temperatur-Gradienten-Thermocycler. Dazu wurden in zwei Schritten insgesamt 16 PCRs von einer reaktiven Patientenprobe durchgeführt. Der variable Temperaturbereich für die Anlagerung lag im ersten Schritt zwischen 50 und 60°C und beim zweiten Schritt zwischen 60 und 70°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarose-Gel-elektrophorese nachgewiesen.

Der Probenansatz für die erste und zweite PCR umfasste jeweils 50 µl. Die eingesetzten Konzentrationen und Mengen der Reagenzien waren bei der ersten PCR sowohl beim Ansatz für die Sanger-Sequenzierung als auch für die Pyrosequenzie-

rung identisch (Tab. 2.2 und 2.3). Die Primer für die zweite PCR wurden bei der PCR für die Pyrosequenzierung in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt, damit gesättigte Reaktionsbedingungen gewährleistet werden konnten. Bei der ersten PCR wurden pro Ansatz pipettiert:

Tab. 2.2. Ansatz für die 1. PCR

Reagenz	Eingesetzte Menge ( $\mu$ l)
PCR-Puffer	5,0
dNTP-Mix	1,0
Hot Start Taq	0,5
HBV GT FW long	0,5 (100 mM)
HBV GT RV1 KI	0,5 (100 mM)
Wasser	37,5
Matrize	5,0

Bei der zweiten PCR wurden pro Ansatz pipettiert:

Tab. 2.3. Ansatz für die 2. PCR

Reagenz	Eingesetzte Menge ( $\mu$ l) für Sanger-Sequenzierung	Eingesetzte Menge ( $\mu$ l) für Pyrosequenzierung
PCR-Puffer	5,0	5,0
dNTP-Mix	1,0	1,0
Hot Start Taq	0,5	0,5
Bio Uni	0,5 (100 mM)	1,0 (10 mM)
HBV GT RV2 KI	0,5 (100 mM)	1,0 (10 mM)
Wasser	37,5	36,5
DNA	5,0	5,0

Bei der zweiten PCR wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt aus der ersten PCR als Matrize eingesetzt. Die Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase befindet sich bei Raumtemperatur in einem inaktiven, stabilisierten Zustand. Die Aktivierung beginnt erst mit der thermischen Zerstörung der Taq-Inhibitorbindung durch eine Verlängerung der initialen Denaturierung auf 15 min. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit folgendem

Programm, in dem die Anlagerungstemperatur in den ersten 15 Zyklen um ein Grad erniedrigt wurde.

95°C	15 min	
95°C	30 s	} 15 Zyklen
70°C -1°C	30 s	
72°C	50 s	
95°C	30 s	} 35 Zyklen
70°C	30 s	
72°C	50 s	
72°C	6 min	
4°C	endlos	

### 2.4 Detektion durch Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in 2%-igen, gebrauchsfertigen Agarosegelen aufgetrennt und nachgewiesen. Dazu werden je 5 µl der Amplifikate in eine Tasche des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Banden werden pro Gel 5 µl eines DNA-Größen-Markers mit geladen. Im elektrischen Feld werden die DNA-Fragmente durch die Maschenstruktur des Agarosegels nach ihrer Größe und Form aufgetrennt. Die Identifizierung der Banden erfolgt durch Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht.

### 2.5 Sanger-Sequenzierung

Bei der Sanger-Sequenzierung wurde die Nukleotidsequenz der amplifizierten und aufgereinigten DNA-Fragmente durch die Cycle-Sequenzierung bestimmt. Dabei wird ein Primer, der an den komplementären DNA-Strang bindet, von einer thermostabilen DNA-Polymerase durch den Einbau von dNTPs in einer linearen PCR verlängert. Im Reaktionsansatz befinden sich zusätzlich die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs). Da bei diesen die Ribose an der 3'-Stelle kein OH besitzt, kann der Strang nicht verlängert werden und es kommt zu

zufälligen Kettenabbrüchen. Die entstandenen unterschiedlichen Abbruchprodukte werden durch Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenz detektiert (85).

Die Aufreinigung der Amplifikate war nur für die Sanger-Sequenzierung erforderlich. Sie erfolgte mit dem MiniElute-PCR-Purification-Kit. Das Prinzip beruht auf der Bindung der DNA (>50 bp) an Silicagel-Membranen, während andere Komponenten die Membran passieren können. Durch mehrere Waschschrte wird die DNA von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt. Anschließend wurde die DNA in einer Pufferlösung eluiert und durch Agarose-Gelelektrophorese detektiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Der PCR-Probenansatz für die Cycle-Sequenzierung umfasste 10 µl. Als Primer für die Cycle-Sequenzierung wurden die Oligonukleotide HBV GT FW long oder HBV GT RV2 KI in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Die zu pipettierende DNA-Menge war abhängig von der Bandenintensität in der Agarosegelelektrophorese und der davon abschätzbaren Konzentration und sollte ca. 1 µg entsprechen. Für die Cycle-Sequenzierung wurden pro Ansatz pipettiert:

**Tab. 2.4. Ansatz für die Cycle-Sequenzierung**

<b>Reagenz</b>	<b>Eingesetzte Menge (µl)</b>
Sequenzier-Puffer	0,5
Big Dye-Mix 1.1	1,0
Primer	1,0
Wasser	ad 7,0
DNA	ca. 0,5-1,0 (max. 7,5)

Der Big Dye-Mix 1.1 enthielt dNTPs, fluoreszenzfarbstoffenmarkierte ddNTPs und Taq-DNA-Polymerase. Die Cycle-Sequenzierung erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

96°C	1 min	} 25 Zyklen
96°C	10 s	

50°C	5 s
60°C	4 min
4°C	endlos

Die automatisierte Aufreinigung der Sequenzierprodukte und die anschließende Kapillarelektrophorese erfolgten im Institut für Klinische Molekularbiologie. Um eine hohe Qualität- der Sequenzierergergebnisse zu ermöglichen, wurden die Sequenzierprodukte über Sephadex G-50 durch Gel-Filtration von überflüssigen ddNTPs, dNTPs, Primern und Polymerasen gereinigt. Die gereinigten Sequenzierprodukte konnten nun in der Kapillarelektrophorese analysiert werden.

Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer untersucht. Das Prinzip beruht auf der Trennung der entstandenen unterschiedlichen Abbruchprodukte nach ihrer Größe. Anschließend wurden die Fluoreszenzfarbstoffe der Didesoxynukletide durch einen Argonlaser angeregt und die Signale durch eine CCD-Kamera aufgenommen.

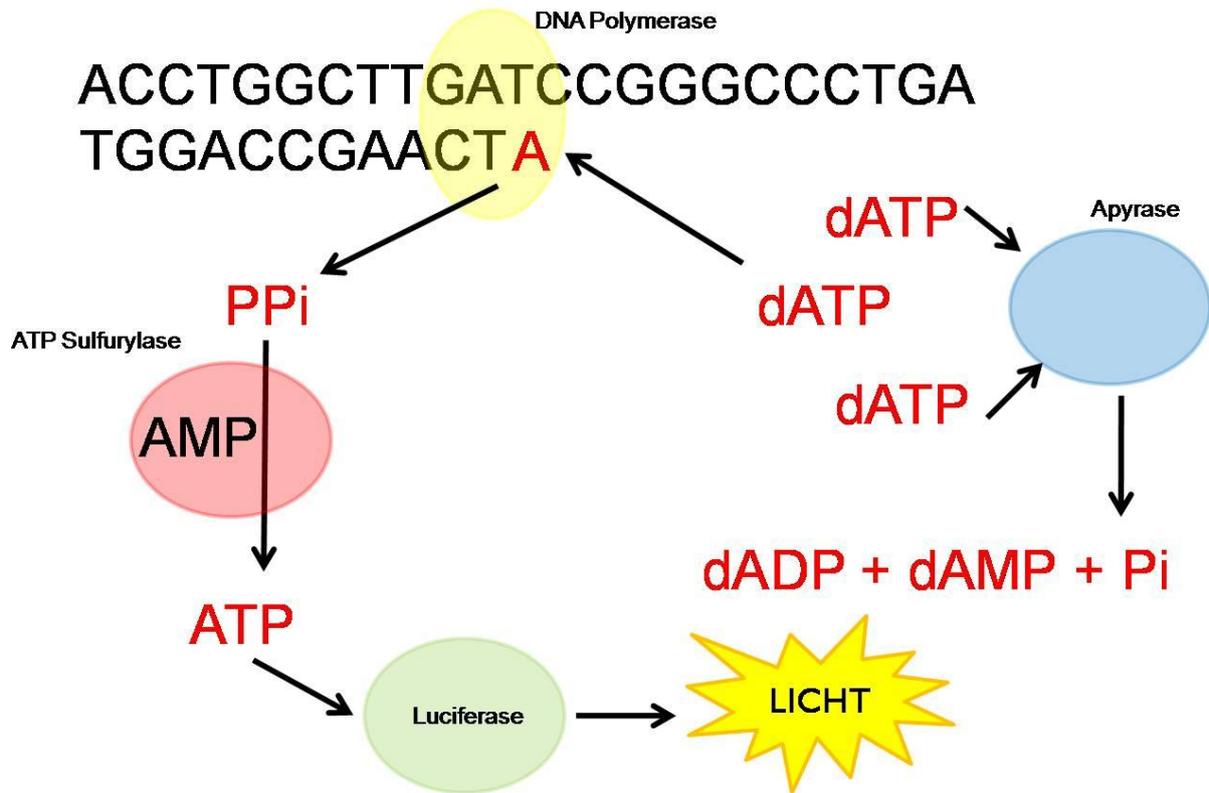
Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Vector-NTI-Contig-Express-Software (Invitrogen). Pro Patientenprobe wurden mit der Sanger-Sequenzierung zwei Sequenzen (sense und antisense) gewonnen. Damit eventuell entstandene Fehler der automatischen Auswertung behoben werden konnten, wurden die beiden Sequenzen mit Hilfe der Contig-Express-Software übereinander gelegt und abgeglichen. Letztendlich entstand eine bereinigte, endgültige Sequenz. Diese wurde mit dem Genotyping-Tool des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda) analysiert und mit Hilfe des Blast-Algorithmus mit einer Resistenzmutations-freien Aminosäuresequenz des HBV verglichen. Der Genotyp und eventuell vorhandene Resistenzmutationen wurden in einer Datenbank zusammengefasst.

### **2.6 Pyrosequenzierung**

Die Pyrosequenzierung (Abbildung 2.2) basiert auf der Detektion von Pyrophosphat (PPi) während der DNA-Kettenverlängerung in Echtzeit. Zum Reaktionsansatz werden nacheinander in zuvor festgelegter Reihenfolge Nukleotid-Triphosphate automatisch pipettiert. Wenn das Nukleotid komplementär zu der nächsten Position der DNA

ist, wird es durch die DNA-Polymerase eingebaut. Bei dieser Reaktion wird PPi abgespalten. Dieses PPi wird durch die ATP-Sulfurylase mit AMP zu ATP umgesetzt. Luciferase wandelt ATP in sichtbares Licht um, indem sie Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert. Dieses Licht wird gemessen und grafisch als Kurvenausschlag (Peak) in einem Diagramm (Pyrogramm) dargestellt. Die Intensität des Lichts ist proportional zu der Menge der eingefügten Nukleotide. Die Sequenz wird somit durch unterschiedlich hohe Peaks im Pyrogramm dargestellt. Durch die separate Zugabe jedes einzelnen der vier Nukleotide und durch die Intensität des gemessenen Lichts ist eine gezielte Zuordnung zur Art und Anzahl der Nukleotide in der zu bestimmenden Sequenz möglich. Das Enzym Apyrase beseitigt danach die nicht eingebauten Nukleotide. Dadurch werden Waschschriffe zwischen den einzelnen Nukleotidzugaben überflüssig (86).

Zur Pyrosequenzierung wird nur der biotinylierte DNA-Strang (sense) benötigt. Aus diesem Grund mussten die PCR-Produkte vorher aufgetrennt und aufgereinigt werden. Dies erfolgte mit dem sogenannten Vacuum-Prep-Tool nach dem angepassten Standardprotokoll des Herstellers. Hierbei wurden zunächst 10 µl des PCR-Produktes mit 30 µl destilliertem Wasser, 5 µl Streptavidin-Sepharose und 40 µl Binde-Puffer für mindestens 5 min geschüttelt. Dabei band das Biotin an die Streptavidin-Sepharose. Anschließend wurde die Lösung durch das Vacuum-Prep-Tool aufgesogen, wobei die an der Streptavidin-Sepharose gebundene DNA von den Filtern des Vacuum-Prep-Tool zurückgehalten wurde. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, mit 0,1 N NaOH denaturiert und schließlich mit Wasch-Puffer gereinigt, so dass an der Streptavidin-Sepharose am Filter nur noch der biotinylierte Einzelstrang gebunden blieb. Dieser wurde in einer Lösung aus 1,6 µl Primer (5-20 mM) und 40 µl Annealing Buffer resuspendiert und 2 min bei 80°C auf einem Thermoblock inkubiert. Beim Abkühlen band der Primer an die einzelsträngige DNA. Beim Erreichen der Raumtemperatur konnte der Ansatz zur Sequenzierung eingesetzt werden.



**Abb. 2.2. Prinzip der Pyrosequenzierung.** Das durch den Einbau von Nukleotid-Triphosphaten, gebildete PPI wird durch die ATP-Sulfurylase in ATP umgewandelt. Luciferase wandelt ATP in sichtbares Licht um, welches detektiert wird. Apyrase beseitigt die nicht eingebauten Mononukleotide.

Insgesamt wurden pro Patientenprobe vier Sequenzierungen durchgeführt. Die für die Pyrosequenzierung verwendeten Primer wurden durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gereinigt und auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt. Für die Pyrosequenzierung wurden die Primer in einer Verdünnung von 5-20 mM verwendet. Die benötigte Verdünnungskonzentration für jeden der vier Primer wurde in einem Vorversuch ermittelt.

Die Pipettier-Reihenfolgen der Nukleotid-Triphosphate für die einzelnen Sequenzierungsansätze können in der Geräte-Software frei gewählt werden. Bei fehlender Kenntnis der zu erwartenden Sequenz können alle vier Nukleotid-Triphosphate abwechselnd hinzupipettiert werden. Dies führt jedoch einerseits zu hohem Nukleotidverbrauch, andererseits durch eine zu schnelle Inaktivierung der Apyrase durch vermehrten Nukleotidabbau zu einer kürzeren Sequenzlänge. Bei einer Kenntnis der zu erwartenden Sequenz, z.B. durch ein vorher durchgeführtes Sequenzalignement von meh-

renen hundert Sequenzen kann eine genauere Pipettier-Reihenfolge erstellt werden, was zu einer Verlängerung der Sequenzlänge führt.

Die Sequenzen der vier Sequenzierprimer und die Pipettier-Reihenfolgen für das Sequenziergerät wurden anhand eines Sequenzalignements von ca. 500 HBV-Sequenzen erstellt und optimiert. Sie sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 aufgeführt.

**Tab. 2.5. Sequenzierprimer**

<b>Primer-Bezeichnung</b>	<b>Oligonukleotidsequenz 5'-3'</b>
HBV GT 587 RV KI	GAT GGG AAT ACA RGT GCA RTT TCC
HBV GT 676 RV KI	ACC ACT GAA CAA ATG KCA CTA GTA AA
HBV GT 755 RV KI	TGY ACA GAC TTG GCC CCC A
HBV GT 844 RV KI	GGG ART ANC CCC AYC DYT TYG TTT T

**Tab. 2.6. Pipettier-Reihenfolge der Nukleotid-Triphosphate für die jeweiligen Sequenzierprimer**

<b>Primer-Bezeichnung</b>	<b>Pipettier-Reihenfolge</b>
HBV GT 587 RV KI	TCGATCGTAGTGTACAGCAGCATGAGCATGATAGAGTGCTGAT GCAGTAGTTCGATGCAGTCTG
HBV GT 676 RV KI	ACTGAGCTAGATGACGACTGAGCAGCTGCATAGTACGTGCGTA GTCATGACTGATGACTGA
HBV GT 755 RV KI	CAGTACACGATCATCATCATAGCTGCAGCAGACAGTCGTGCAG CTGACGCATCACTGA
HBV GT 844 RV KI	TGACTGCATGTCAGATGTATGTATCAGCAGATCAGCAGATAGT ATCAGACGTCATATGACTCAC

## 2.7 Datenbankerstellung

Zur späteren Auswertung der Pyrogramme mit der Identifire<sup>®</sup>-Software (Biotage) wurde eine Datenbank aus ungefähr 500 publizierten HBV-Sequenzen (vorrangig der Genotypen A und D) aufgebaut. Dazu wurden Referenzsequenzen der einzelnen HBV-Genotypen in das Nukleotid-Sequenzen-Suchprogramm BLAST des NCBI eingegeben, die gefundenen, verwandten Sequenzen mit dem NCBI-Genotyping-Tool analysiert und letztendlich zu einer Roh-Datenbank zusammengefasst. Diese wurden mit dem Programm Vector-NTI (Invitrogen) auf den Bereich, der für die Genotypisie-

nung und Resistenzlokalisierung erforderlich ist, verkürzt und nach ihrem Genotyp geordnet gespeichert.

## 2.8 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7. Verwendete Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
2%iges gebrauchsfertiges Agarosegel	Invitrogen, Karlsruhe
Agarosegel-Halter	Invitrogen, Karlsruhe
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Centrifuge 5417c	Eppendorf, Hamburg
Monoshake (Shaker)	Variomag, Daytona Beach/USA
Mycycler (Gradienten-Thermocycler)	BioRad, München
PyroMark ID Instrument	Biotage, Uppsala/Schweden
Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Vacuum-Prep-Tool	Biotage, Uppsala/Schweden
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia/USA

## 2.9 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in der Tabelle 2.8 aufgeführt.

**Tabelle 2.8. Verwendete Chemikalien und Lösungen**

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Firma</b>
10x PCR-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	QIAGEN, Hilden
Aqua dest.	
Annealing Buffer	Biotage, Uppsala/Schweden
Basenpaar-Marker	Bioline, Luckenwalde
Big Dye-Mix 1.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Binde-Puffer	Biotage, Uppsala/Schweden
Carrier DNA	Amersham Biosciences, Freiburg

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Firma</b>
Denaturation Solution	Biotage, Uppsala/Schweden
dNtp Mix (10mM)	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Buffer 10x	Applied Biosystems, Darmstadt
Enzyme mixture	Biotage, Uppsala/Schweden
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Hot Start Taq (5U/µl)	QIAGEN, Hilden
Illustra AutoSeq G-50 Dye	GE Healthcare, München
MiniElute PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Molekularbiologisch reines Wasser	QIAGEN, Hilden
Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Biotage, Uppsala/Schweden
Performance-optimized Polymer 6	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer	Metabion, Martinsried
1. PCR HBV GT FW long, HBV GT RV1 KI	
2. PCR Bio Uni, HBV GT RV2 KI	
Pyrosequenzierung HBV 587 RV KI, HBV 676 RV KI HBV 755 RV KI, HBV 844 RV KI	
Protease	QIAGEN, Hilden
QIAmp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt
Streptavidin-Sepharose	GE Healthcare, München
Substrat mixture	Biotage, Uppsala/Schweden
Terminator Removal Kit	QIAGEN, Hilden
Wasch-Puffer	Biotage, Uppsala/Schweden

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Datenbank

Die zur Auswertung genutzte Datenbank enthielt insgesamt 428 HBV-Sequenzen aus dem Polymerase-Gen. Die Anzahl der Sequenzen der einzelnen Genotypen ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

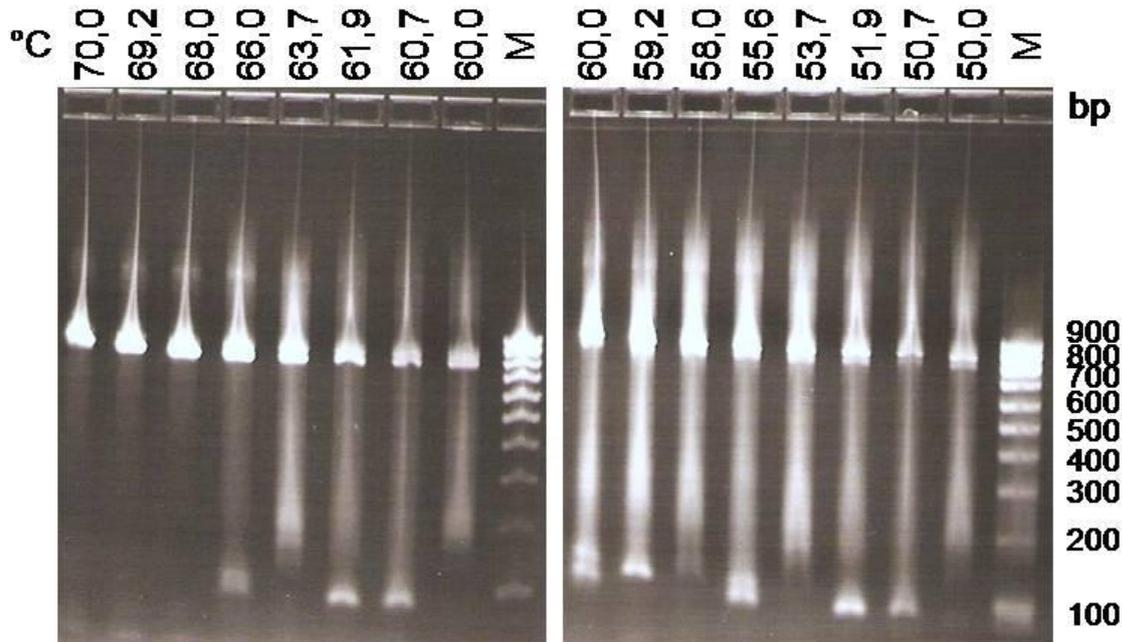
Tab. 3.1. Anzahl der Sequenzen in der Datenbank

Genotyp	Anzahl
A	116
B	52
C	50
D	98
E	43
F	43
G	14
H	12

Die aus der Pyrosequenzierung gewonnenen Sequenzen sind rückwärts-komplementär. Damit sie mit der Identifire<sup>®</sup>-Software ausgewertet werden konnten, mussten die Sequenzen der Datenbank ebenfalls in ihre rückwärts-komplementäre Form umgewandelt werden. Zugleich wurden sie auf eine Länge von ca. 860 bp verkürzt, damit der Alignment-Vorgang der Software bei der Auswertung beschleunigt werden konnte. Der Sequenzabschnitt von 860 bp entspricht ungefähr dem in der PCR amplifizierten DNA-Abschnitt. Somit enthält er alle Bereiche, die für die Genotypisierung und Resistenzlokalisierung notwendig sind. Die Datenbank kann durch neue, aus der Sanger- oder Pyrosequenzierung gewonnene Sequenzen ergänzt werden. Somit entsteht eine stetig größer werdende Anzahl an Sequenzen, die als Quelle für die Auswertung von neuen Sequenzen dienen kann.

### 3.2 Optimierung der Anlagerungs-Temperatur

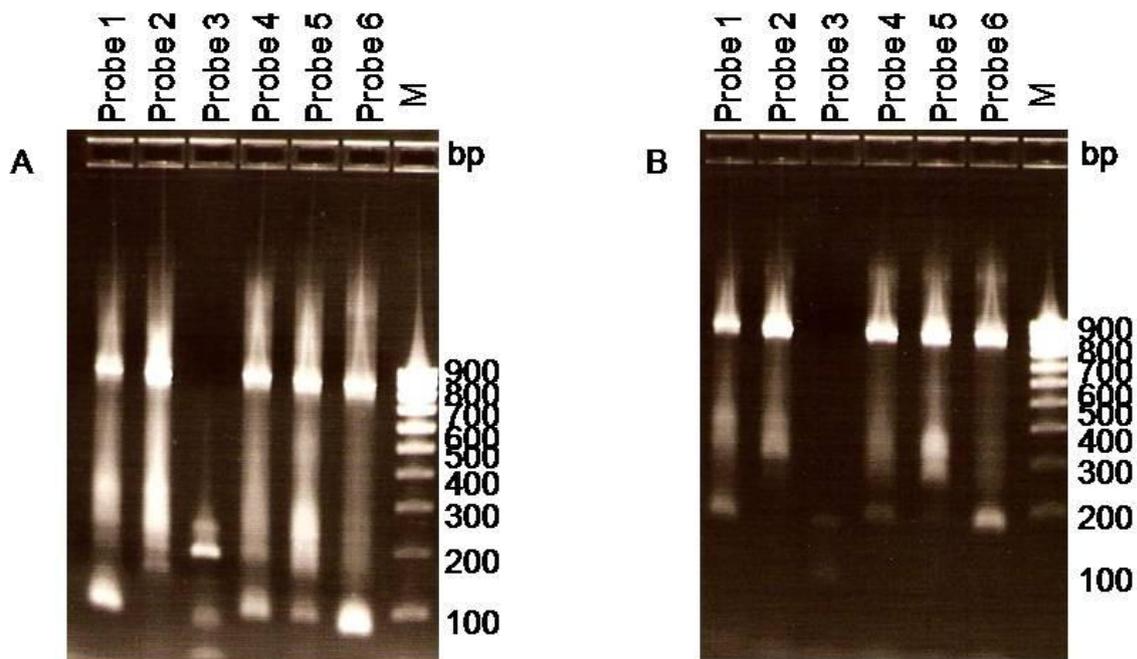
Die Anlagerungs-Temperatur sollte 50-70°C betragen. Bei dieser Temperatur binden die Primer bei der PCR an die einzelsträngige DNA. Je höher die Anlagerungs-Temperatur ist, desto spezifischer ist die Bindung der Primer an die einzelsträngige DNA. So können bei einer niedrigeren Anlagerungs-Temperatur unerwünschte Nebenprodukte entstehen, weil die Primer an mehrere Stellen der einzelsträngigen DNA binden oder Primer-Dimere bilden. Die zu Beginn verwendete PCR war eine *touch-down*-PCR. Diese erhöht die Spezifität der PCR. Dabei wird die Anlagerungs-Temperatur schrittweise 1-2°C pro Zyklus reduziert, bis sie die geschätzte Schmelztemperatur der Primers ( $T_m$ ) erreicht. Die Anlagerungs-Temperatur betrug zu Beginn 70°C und wurde jeweils um 1°C in 15 Zyklen auf 55°C reduziert. Bei den folgenden 35 Zyklen betrug die Anlagerungs-Temperatur 50°C. Leider entstanden dabei bei einigen Patientenproben unerwünschte Nebenprodukte und ein „Hintergrundschmier“, die in der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnten. Die durchgeführte Sequenzierung von diesen Patientenproben war nicht auswertbar (Abb. 3.2A).



**Abb. 3.1. Optimierung der Anlagerungs-Temperatur im Gradienten-Thermocycler.** Bei ansteigender Anlagerungs-Temperatur entstehen immer spezifischere PCR-Produkte. Bei 68°C, 69,2°C und 70°C sind gar keine Nebenprodukte und kein „Hintergrundschmier“ mehr nachweisbar. Zur Größenbestimmung der Banden wurde ein 100 bp-Größenmarker (M) eingesetzt.

Zur Verbesserung der Qualität der PCR-Produkte wurde versucht, mit einem Gradienten-Thermocycler eine optimale Anlagerungs-Temperatur zu finden. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer ansteigenden Anlagerungs-Temperatur immer weniger Nebenprodukte und „Hintergrundschmier“ in der Agarose-Gelelektrophorese nachzuweisen waren (Abb. 3.1).

Mit dieser Erkenntnis wurde die *touchdown*-PCR auf eine *touchdown and jump*-PCR umgestellt. Hierbei wird die Anlagerungs-Temperatur nach Erreichen der geschätzten Schmelztemperatur des Primers wieder auf einen höheren Wert gesetzt. Die Anlagerungs-Temperatur betrug wie bei der *touchdown*-PCR zu Beginn 70°C und wurde jeweils um 1°C in 15 Zyklen auf 55°C reduziert. Bei den folgenden 35 Zyklen wurde die Anlagerungs-Temperatur wieder auf 70°C angehoben. In der Agarose-Gelelektrophorese konnte eine Optimierung der Qualität der PCR-Amplifikate nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Außerdem waren die PCR-Produkte jetzt sequenzierbar.



**Abb. 3.2. Nachweis der PCR-Amplifikate vor (A) und nach (B) Änderung der Anlagerungs-Temperatur.** Bei fünf Patientenproben konnte durch die Anhebung der Anlagerungs-Temperatur in den letzten 35 Zyklen auf 70°C die Qualität der Amplifikate optimiert werden (*touch down and jump*). Bei einer Patientenprobe konnte kein PCR-Produkt gewonnen werden. Zur Größenbestimmung der Banden wurde ein 100 bp-Größenmarker (M) eingesetzt.

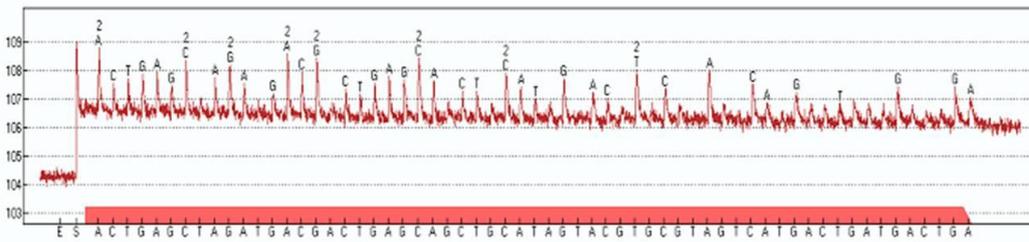
### 3.3 Optimierung der Pyrosequenzierung

Die Ergebnisse der ersten Sequenzierungsdurchläufe nach Herstellerprotokoll waren oft fehlerhaft und schwer auswertbar. Durch Optimierung der Methode konnten die Qualität der Ergebnisse deutlich verbessert werden.

In den ersten Sequenzierungsdurchläufen wurden für die Pyrosequenzierung Primer (HBV GT 587 RV KI, HBV GT 676 RV KI, HBV GT 755 RV KI, HBV GT 844 RV KI) verwendet, die nicht zusätzlich über HPLC gereinigt waren. Die gewonnenen Sequenzen waren oft schwer oder nicht auswertbar (Abb. 3.3A). Durch die HPLC-Reinigung werden Verunreinigungen wie Fehlsequenzen aus der Oligonukleotid-Suspension herausgefiltert. Durch Verwendung HPLC-gereinigter Primer konnte die Qualität der gewonnenen Sequenzen verbessert werden (Abb. 3.3B). Ein weiterer Optimierungsschritt war die Anpassung der Primerkonzentration. Laut Standardprotokoll des Herstellers sollte die zu verwendende Primerkonzentration 0,4  $\mu\text{M}$  betragen. In einem Vorversuch wurden Primer mit der Konzentration 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$  und 0,8  $\mu\text{M}$  verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass je nach Primer und Charge eine andere Konzentration bessere Sequenzierungsergebnisse lieferte. Daraus wurde geschlossen, dass jede Primer-Charge in einem Vorversuch austitriert werden sollte.

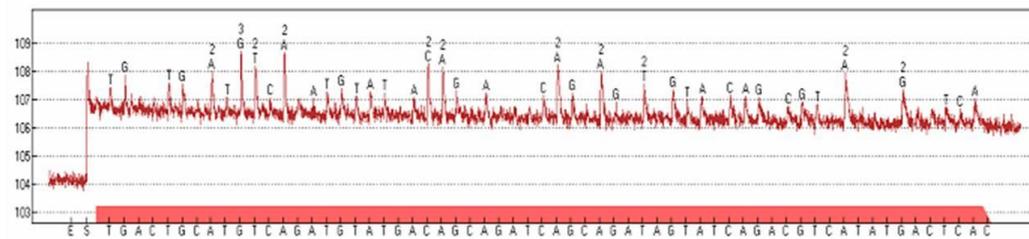
Zur Verbesserung der Qualität der Sequenzen wurde das Standardprotokoll für die Präparation der einzelsträngigen Matrizen optimiert. Zur Erhöhung der DNA-Bindekapazität wurde die Menge der Streptavidin-Sepharose von 3 auf 5  $\mu\text{l}$  erhöht. Desweiteren wurden die Zeiten der einzelnen Waschschriffe verlängert, damit eine optimale Auftrennung der Doppelstrang-DNA gewährleistet wurde.

**A** Patientenprobe 800  
Primer HBV GT 676 RV KI



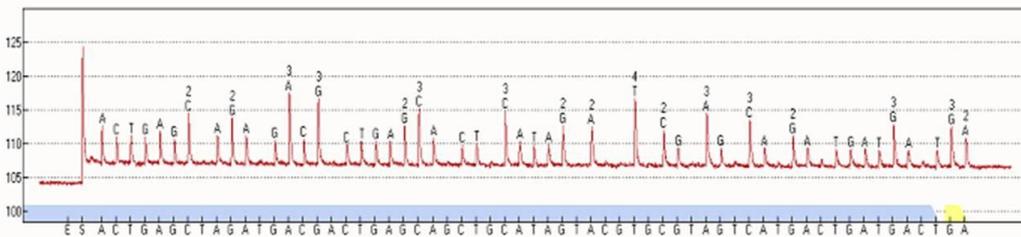
antisense AACTGAGCCAGGAGAACGGCTGAGCCACTCCATGACTTCACAGTGG A

**Patientenprobe 800**  
Primer HBV GT 844 RV KI



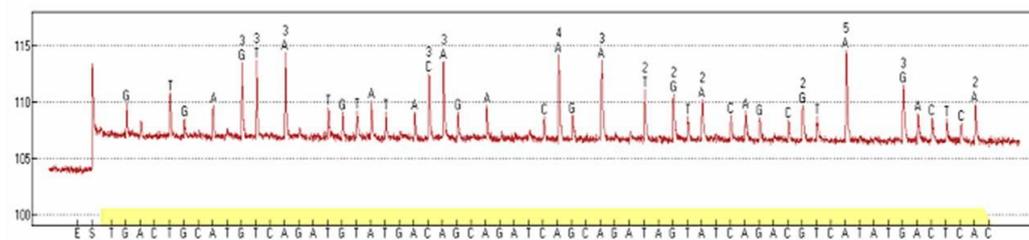
antisense TGTGAATGGGTCAAATGTATACCAAGACAAGAAGTTGTACAGCGTAAGGTCA

**B** Patientenprobe 800  
Primer HBV GT 676 RV KI



antisense ACTGAGCCAGGAGAAACGGGCTGAGGCCACTCCCATAGGAATTTCCGAAAGCCCAGGATGATGGGATGGGAA

**Patientenprobe 800**  
Primer HBV GT 844 RV KI

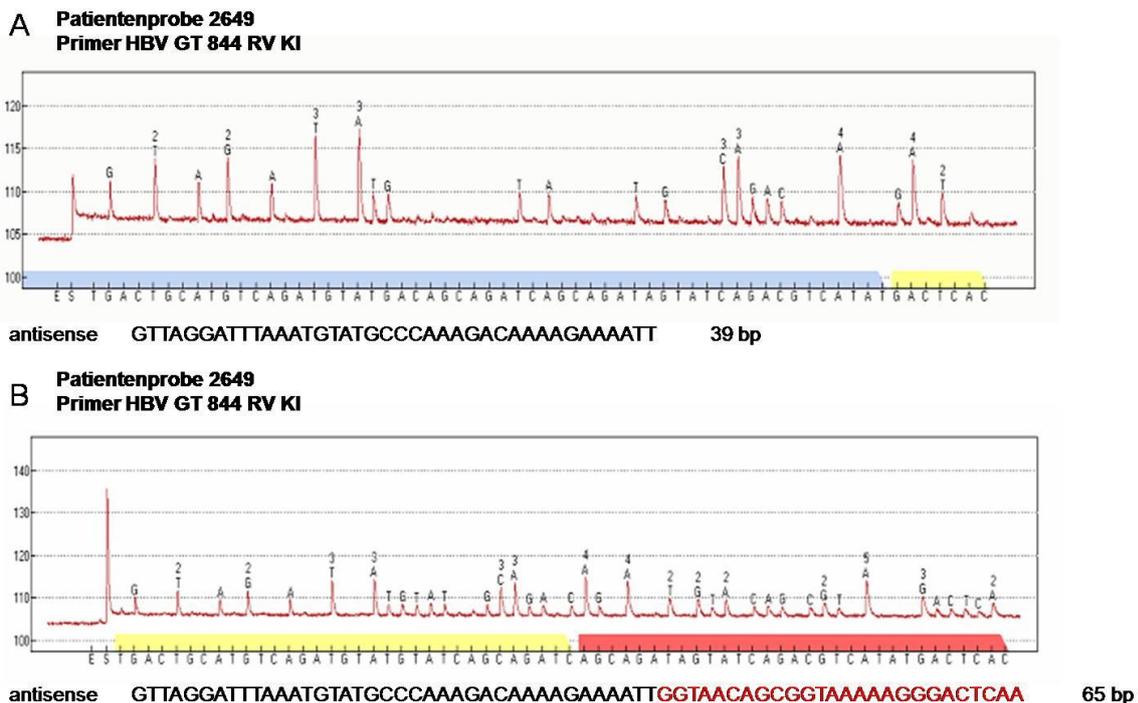


antisense GTGAGGGTTTAAATGTATACCAAAAGACAAAAGAAAATTGGTACAGCGGTAAAAAGGGACTCAA

**Abb. 3.3. Pyrogramme eines Sequenzabschnittes der Patientenprobe 800 mit den Sequenzieransätzen HBV GT 676 RV KI und HBV GT 844 RV KI vor (A) und nach (B) der Optimierung der Primer.**

Die durchschnittliche Länge der detektierten Sequenz pro Ansatz mit dem Primer HBV GT 844 RV KI betrug ca. 70 bp. Nach Durchlauf aller Sequenzierungen wurde allerdings festgestellt, dass die Länge einzelner Sequenzen bei dem Sequenzieran-

satz HBV GT 844 RV KI nur 30 bis 38 bp betrug. Nach Analyse der Pipettier-Reihenfolge anhand eines Sequenzalignements von ca. 500 HBV-Sequenzen wurde festgestellt, dass die Pipettier-Reihenfolge fehlerhaft war und es vorzeitig zu einem Abbruch der Sequenz kam. Daraufhin wurde die Pipettier-Reihenfolge um zwei Nukleotide (Desoxythymidintriphosphat an 21 und 23 Stelle, Tab. 3.2) ergänzt. Nach der Optimierung hatten die vormals zu kurzen Sequenzen nun eine Länge von ca. 70 bp (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4.** Pyrogramme eines Sequenzabschnittes der Patientenprobe 2649 mit dem Sequenzierungsansatz HBV GT 844 RV KI vor (A) und nach (B) der Optimierung der Pipettier-Reihenfolge. Die Länge der Sequenz betrug vor Optimierung der Pipettierreihenfolge nur 39 bp (A). Im Pyrogramm waren in der Mitte große Lücken zu erkennen. Nach der Optimierung waren keine Lücken mehr zu erkennen. Die Sequenz war um 26 bp (rot markierter Bereich) verlängert (B).

**Tab. 3.2.** Alte und neue Pipettier-Reihenfolge des Sequenzierprimers HBV GT 844 RV KI

Primer-Bezeichnung	Pipettier-Reihenfolge
HBV GT 844 RV KI „alt“	TGACTGCATGTCAGATGTATGACAGCAGATCAGCAGATAGT ATCAGACGTCATATGACTCAC
HBV GT 844 RV KI „neu“	TGACTGCATGTCAGATGTATG <b>TAT</b> CAGCAGATCAGCAGATA GTATCAGACGTCATATGACTCAC

Durch die oben genannten Optimierungsschritte konnte die Qualität und somit die Auswertbarkeit der gewonnenen Sequenzen verbessert werden. Ebenso wurden durch Veränderung der Pipettier-Reihenfolge einzelne Sequenzfolgen verlängert.

#### **3.4 Etablierung der Pyrosequenzierung**

Zur Etablierung der Pyrosequenzierung als neue Methode für die Genotypisierung und Resistenzbestimmung von HBV-Proben wurde sie mit der Sanger-Sequenzierung als schon bewährte Methode verglichen. Dazu wurden zunächst 26 HBV-positive Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin mit der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung untersucht. Die aus den beiden Methoden gewonnenen Sequenzen der DNA-Polymerase wurden genotypisiert und auf Resistenzmutationen überprüft. Die Ergebnisse der beiden Methoden wurden daraufhin miteinander verglichen. Im ersten Sequenzierungsdurchlauf enthielten die Ergebnisse der Pyrosequenzierung mehrere Fehler und waren schwer auswertbar. Nach Optimierung der Methode wurden die 26 Patientenproben erneut sequenziert und lieferten vergleichbare Ergebnisse mit der Sanger-Sequenzierung. Daraufhin wurden 20 Patientenproben aus der Medizinischen Klinik I mit den beiden Methoden sequenziert und die Ergebnisse wurden verglichen. Auch in diesem Fall waren die Ergebnisse vergleichbar. Abschließend wurde die Methode in einem Ringversuch (External quality assessment) zur HBV-Genotypisierung (QCMD-Ringversuch HBVGT07) überprüft. Das Quality Control of Molecular Diagnostics (QCMD, Glasgow) ist eine europäische Non-Profit-Organisation zur Qualitätssicherung in der molekularen Diagnostik, die durch die Fachgesellschaften European Society for Clinical Virology (ESCV) und European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) und die Europäische Union initiiert wurde. Dazu wurden wie in den beiden anderen Versuchsreihen die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander verglichen und sie erbrachten identische Befunde.

#### **3.5 Ergebnisse für Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin**

Bei der Genotypisierung der 26 Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin waren die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung identisch. Dabei wurden die Polymerase-Gene aus zehn Patientenproben als Geno-

typ A, aus 13 Patientenproben als Genotyp D und aus drei Patientenproben als Genotyp E identifiziert. Auch bei der Resistenzbestimmung wurden durch die beiden Methoden bei zwei Patientenproben die gleichen Resistenzmutationen nachgewiesen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3. Übersicht der Ergebnisse der Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin

Proben Nr.	Genotyp	V173L	L180M	A181V/T	M204V/I	N236T
0705	A	--	--	--	--	--
0743	A	--	--	--	--	--
0978	A	--	--	--	--	--
0844	A	--	--	--	--	--
1182	A	--	--	--	--	--
1660	A	--	--	--	--	--
2455	A	--	--	--	--	--
2463	A	--	M	--	V	--
2740	A	--	--	--	--	--
3257	A	--	--	--	--	--
0521	D	--	--	--	--	--
0773	D	--	--	--	--	--
0800	D	--	--	--	--	--
1023	D	--	--	--	--	--
1298	D	--	--	--	--	--
1707	D	--	--	--	--	--
1955	D	--	--	--	--	--
2131	D	--	--	--	--	--
2546	D	--	M	--	--	--
2649	D	--	--	--	--	--
2879	D	--	--	--	--	--
3006	D	--	--	--	--	--
3849	D	--	--	--	--	--
1047	E	--	--	--	--	--
3073	E	--	--	--	--	--
3852	E	--	--	--	--	--

Die Patientenprobe mit der Nummer 2546 enthält eine Mutation von Leucin zu Methionin an der Position 180 (rtL180M) der Aminosäurekette der DNA-Polymerase. Hierbei handelt es sich um eine Virus-Fitness-Mutation. Diese Mutation wurde sowohl bei der Sanger-Sequenzierung (Abb. 3.5) als auch bei der Pyrosequenzierung (Abb. 3.6) nachgewiesen.

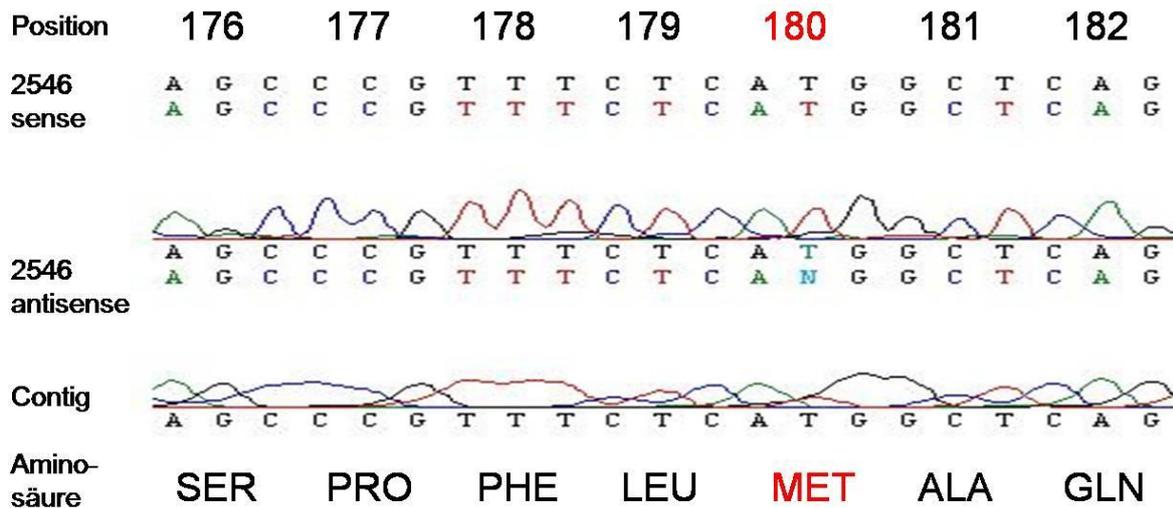


Abb. 3.5. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung der Patientenprobe 2546. Bei der Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) der Aminosäurekette festgestellt.

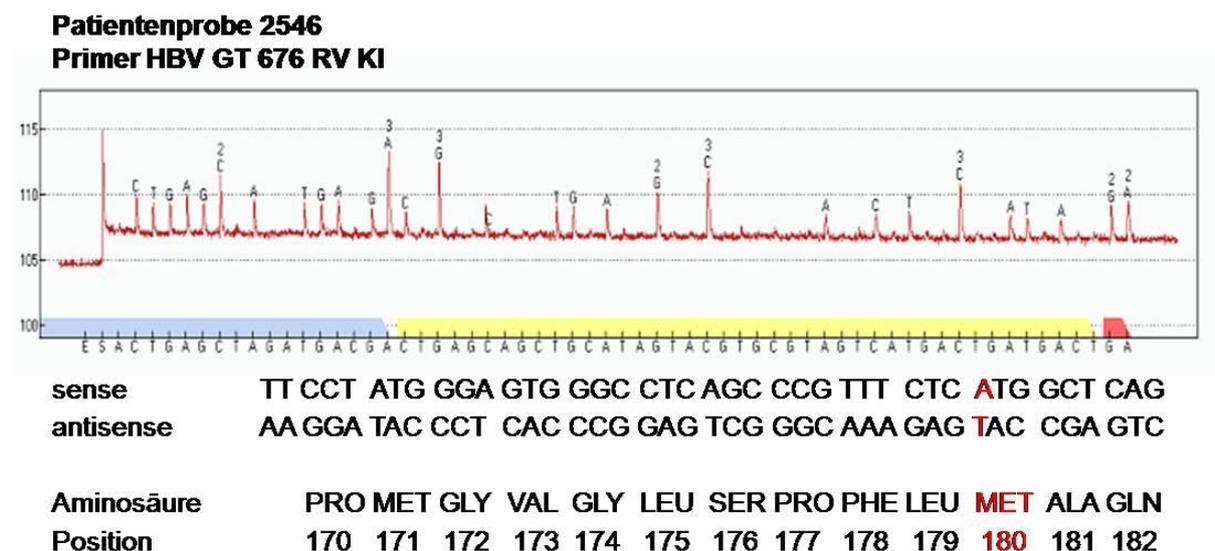


Abb. 3.6. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes der Patientenprobe 2546 mit dem Sequenzierungsansatz HBV GT 676 RV KI. Die Nukleotidsequenz aus dem Pyrogramm (antisense) wurde komplett ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) der Aminosäurekette festgestellt.

Bei der Patientenprobe 2463 wurden zwei Mutationen festgestellt. Dabei handelt es sich einmal um eine Mutation von Methionin zu Valin an der Position 204 (rtM204V) (Abb. 3.7 und 3.8) und eine Mutation von Leucin zu Methionin an der Position 180 (rtL180M) (Abb. 3.9 und 3.10). Somit liegt bei dieser Patientenprobe eine Lamivudin-Resistenzmutation mit zusätzlicher kompensatorischer Virus-Fitness-Mutation vor. Beide Methoden konnten die beiden Mutationen gleichermaßen identifizieren.

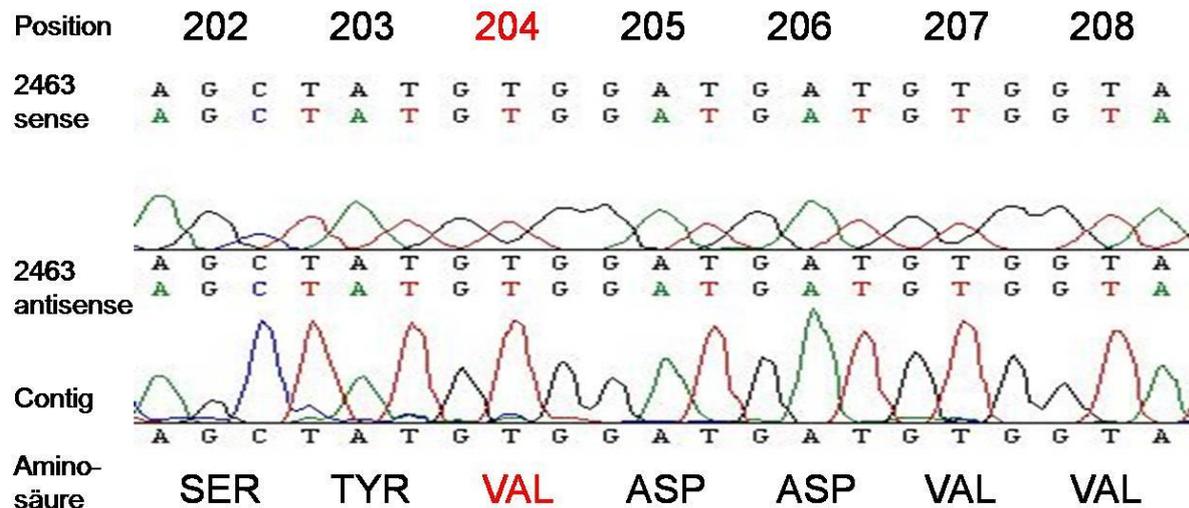
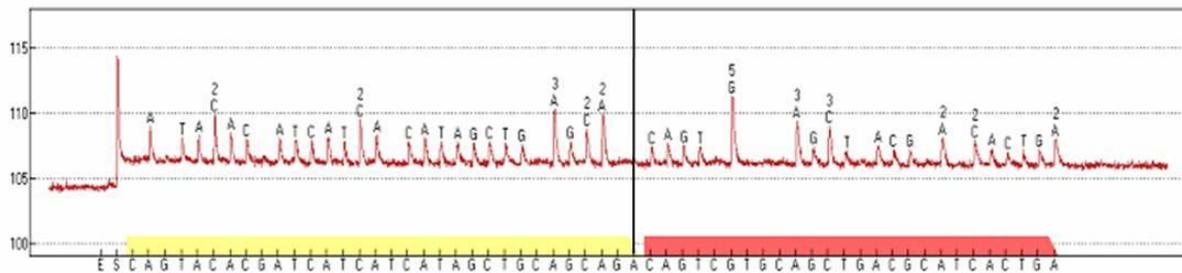


Abb. 3.7. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung des YMDD-Motivs der Patientenprobe 2463. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) der Aminosäurekette nachgewiesen.

**Patientenprobe 2463**  
**Primer HBV GT 755 RV KI**



sense	TTG	GCT	TTC	AGC	TAT	GTG	GAT	GAT	GTG	GTA	T
antisense	AAC	CGA	AAG	TCG	ATA	CAC	CTA	CTA	CAC	CATA	
Aminosäure	LEU	ALA	PHE	SER	TYR	VAL	ASP	ASP	VAL	VAL	
Position	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	

Abb. 3.8. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes des YMDD-Motivs der Patientenprobe 2463 mit dem Sequenzieransatz HBV GT 755 RV KI. Die Nukleotidsequenz aus dem Pyrogramm (antisense) wurde bis zum schwarzen Balken ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäure-Sequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) nachgewiesen.

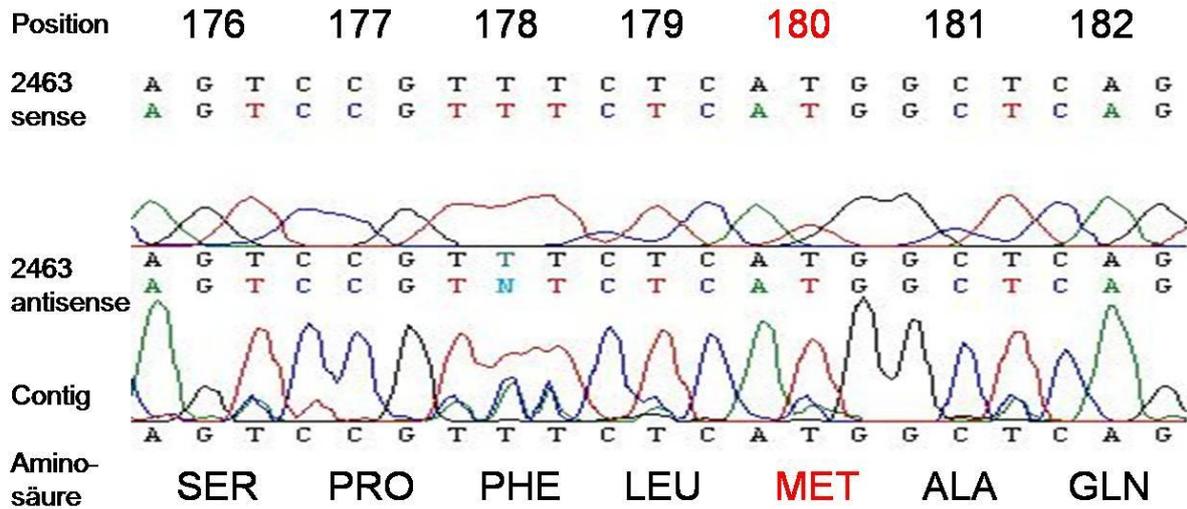


Abb. 3.9. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung der Patientenprobe 2463. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) der Aminosäurekette festgestellt.

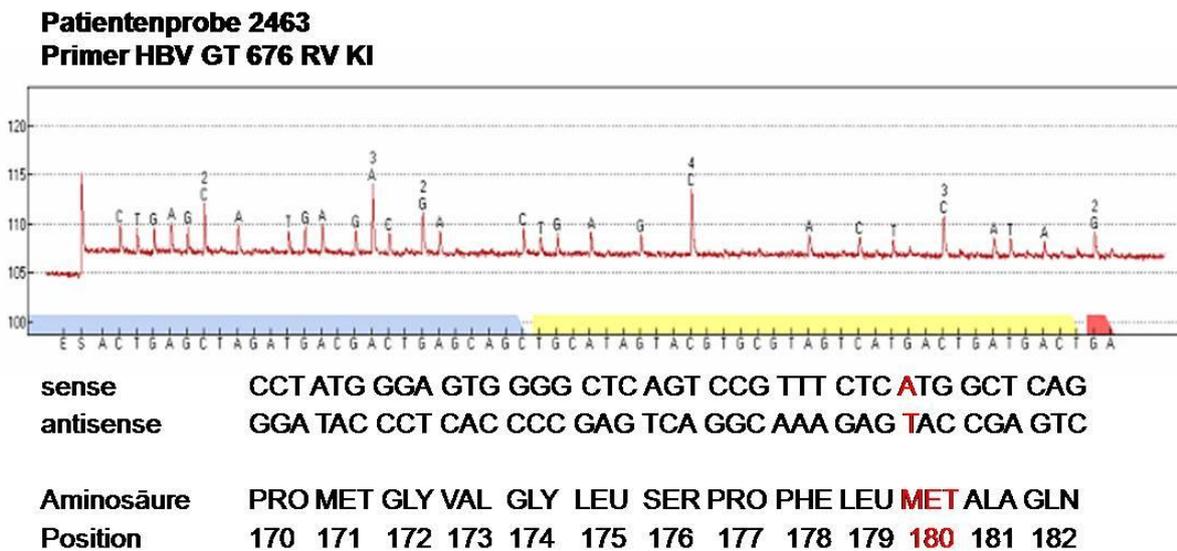


Abb. 3.10. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes der Patientenprobe 2463 mit dem Sequenzierungsansatz HBV GT 676 RV KI. Die Nukleotidsequenz auf dem Pyrogramm (antisense) wurde komplett ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäure-Sequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) der Aminosäurekette festgestellt.

Bei den Patientenproben aus dem Institut für Infektionsmedizin wurden sowohl bei der Sanger-Sequenzierung als auch bei der Pyrosequenzierung die gleichen drei Mutationen nachgewiesen.

### 3.6 Ergebnisse für Patientenproben aus der Medizinischen Klinik I

Bei der Genotypisierung der 20 Patientenproben aus der Medizinischen Klinik I wurden bei der Sanger-Sequenzierung und bei der Pyrosequenzierung die gleichen Ergebnisse erzielt. Dabei wurden fünf Patientenproben als Genotyp A, eine Patientenprobe als Genotyp C, zwölf Patientenproben als Genotyp D und zwei Patientenproben als Genotyp E identifiziert. Beide Methoden wiesen bei zwei Patientenproben die gleichen Resistenzmutationen nach (Tab. 3.4).

Tab. 3.4. Übersicht der Ergebnisse der Patientenproben aus der Medizinischen Klinik I

Proben Nr.	Genotyp	V173L	L180M	A181V/T	M204V/I	N236T
06432	A	--	--	--	I	--
07093	A	--	--	--	--	--
10189	A	--	--	--	--	--
11003	A	--	M	--	V	--
17299	A	--	--	--	--	--
18982	C	--	--	--	--	--
05940	D	--	--	--	--	--
07284	D	--	--	--	--	--
09250	D	--	--	--	--	--
10219	D	--	--	--	--	--
10792	D	--	--	--	--	--
10797	D	--	--	--	--	--
13132	D	--	--	--	--	--
13505	D	--	--	--	--	--
15963	D	--	--	--	--	--
16516	D	--	--	--	--	--
16517	D	--	--	--	--	--
18365	D	--	--	--	--	--
02309	E	--	--	--	--	--
06688	E	--	--	--	--	--

Die Patientenprobe 6432 enthält eine Lamivudin-Resistenzmutation. Es handelt sich dabei um eine Mutation von Methionin zu Isoleucin an der Position 204 (rtM204I). Sowohl die Sanger-Sequenzierung als auch die Pyrosequenzierung konnten die Mutation identifizieren (Abb. 3.11 und 3.12).

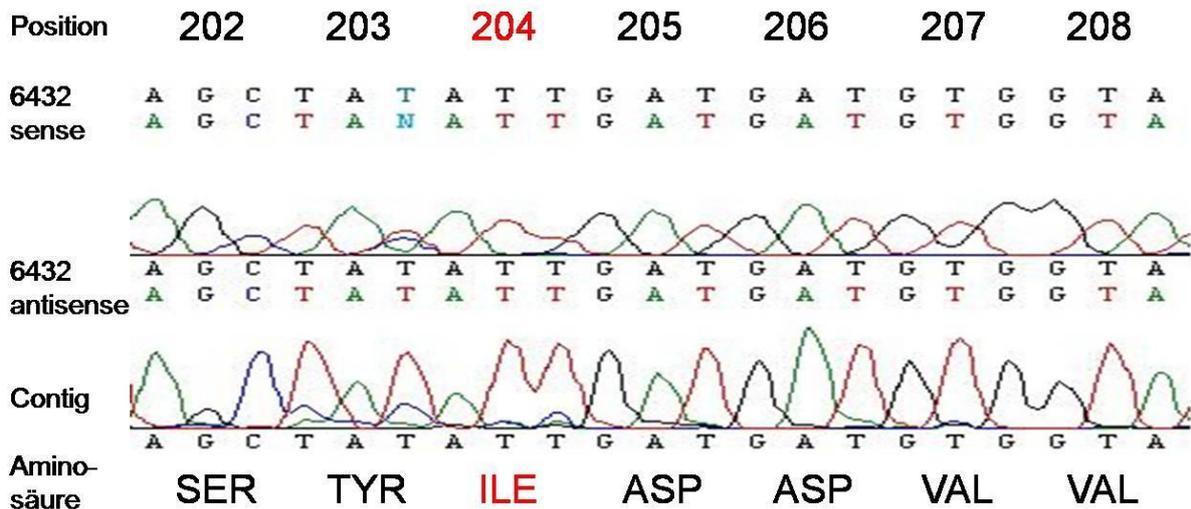


Abb. 3.11. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung des YMDD-Motivs der Patientenprobe 6432. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Isoleucin an Position 204 (rtM204I) nachgewiesen.

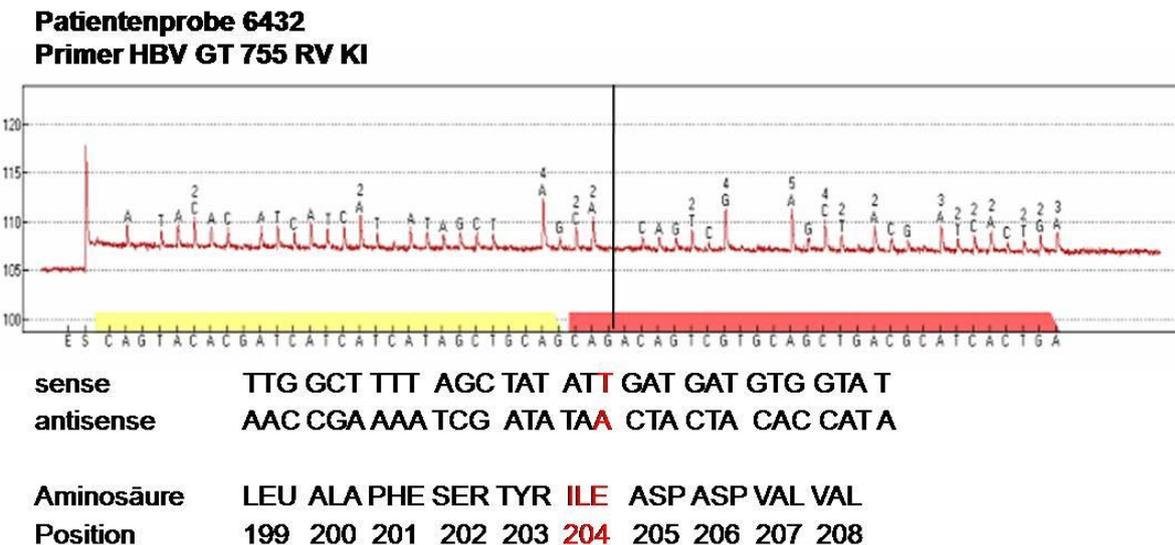
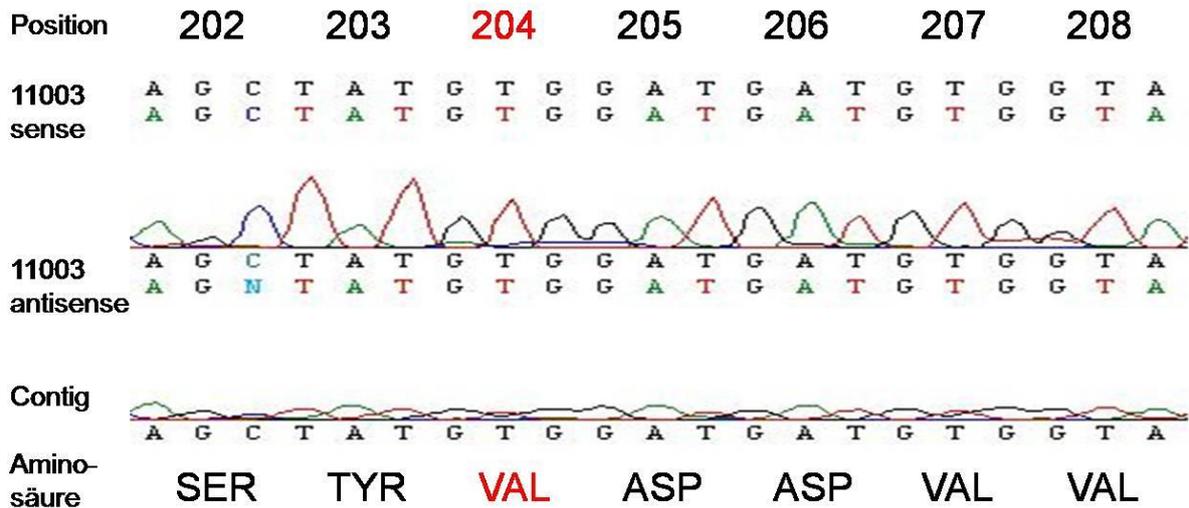
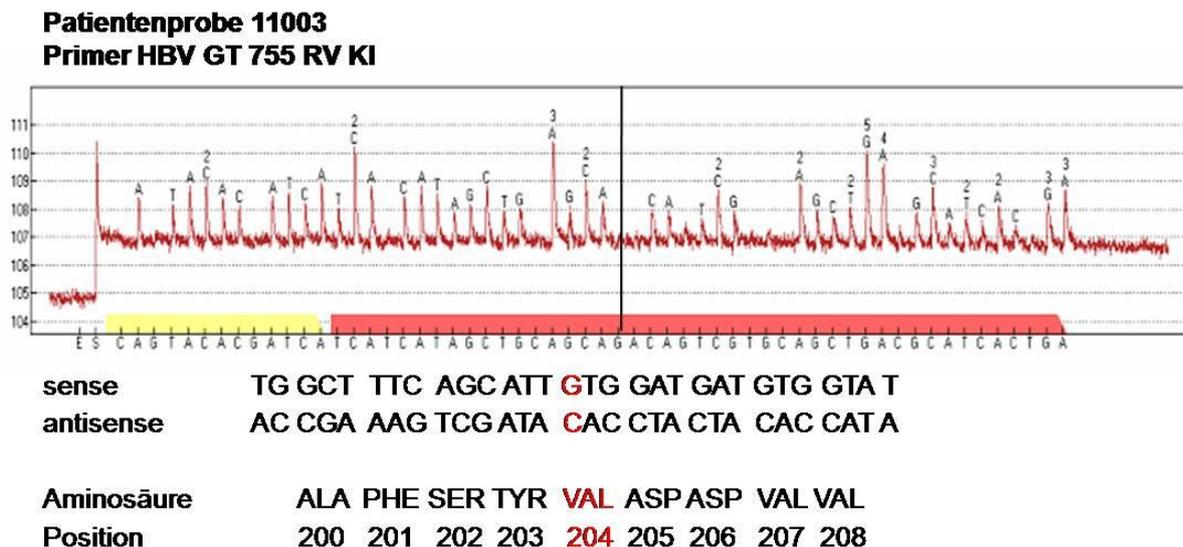


Abb. 3.12. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes des YMDD-Motivs der Patientenprobe 6432 mit dem Sequenzieransatz HBV GT 755 RV KI. Die Nukleotidsequenz auf dem Pyrogramm (antisense) wurde bis zum schwarzen Balken ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Isoleucin an Position 204 (rtM204I) nachgewiesen.

Bei der Patientenprobe 11.003 wurde eine Lamivudin-Resistenzmutation mit zusätzlicher kompensatorischer Virus-Fitness-Mutation nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) (Abb. 3.13 und 3.14) und von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) (Abb. 3.15 und 3.16). Beide Mutationen konnten mit den beiden Methoden nachgewiesen werden.



**Abb. 3.13. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung des YMDD-Motivs der Patientenprobe 11003.** Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) nachgewiesen.



**Abb. 3.14. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes des YMDD-Motivs der Patientenprobe 11003 mit dem Sequenzieransatz HBV GT 755 RV KI.** Die Nukleotidsequenz auf dem Pyrogramm (antisense) wurde bis zum schwarzen Balken ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) nachgewiesen.

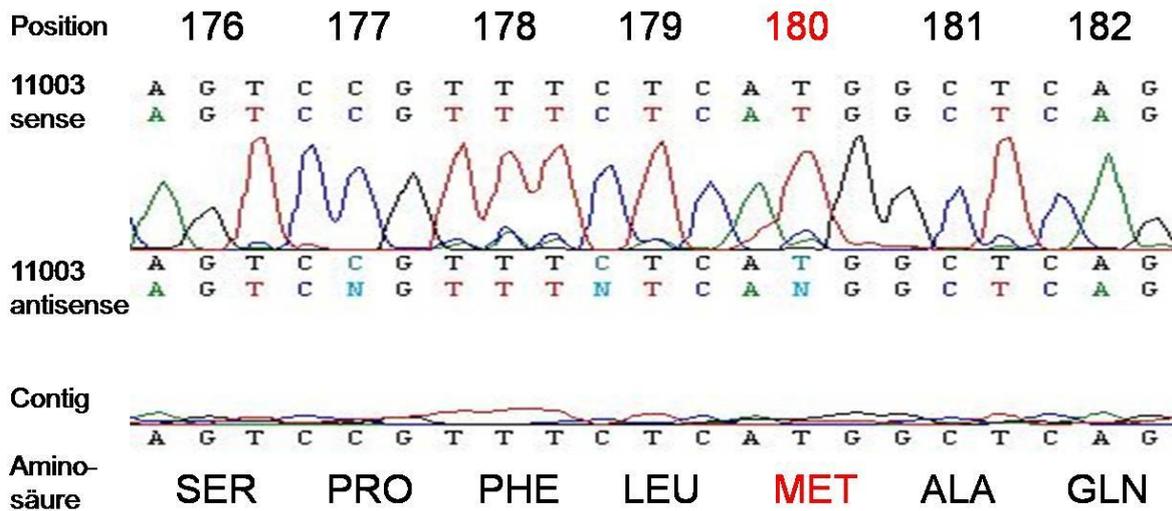


Abb. 3.15. Sequenzabschnitt einer Sanger-Sequenzierung der Patientenprobe 11003. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) festgestellt.

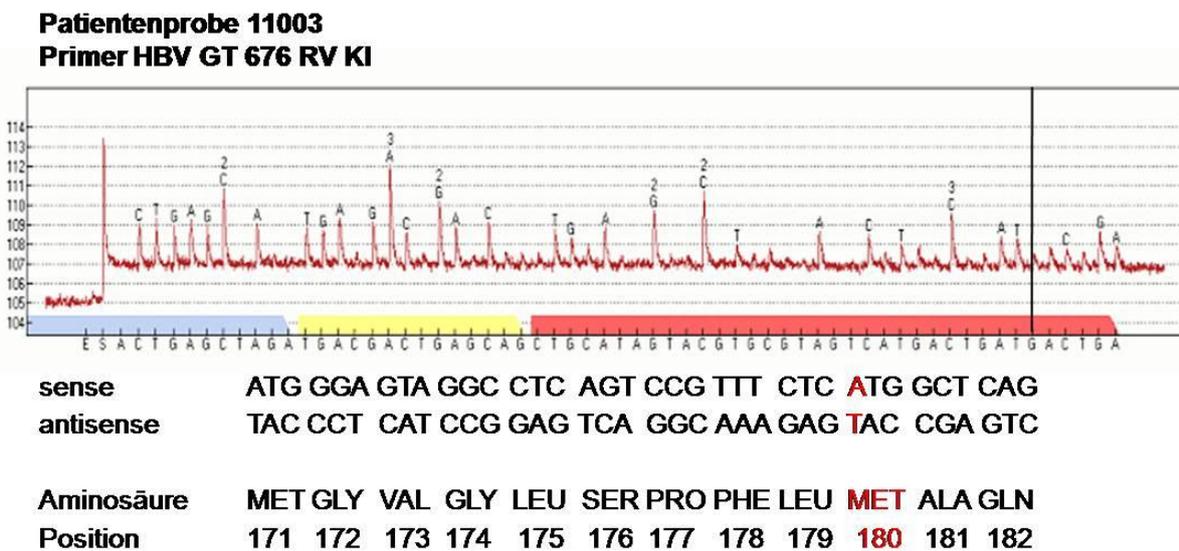


Abb. 3.16. Pyrogramm eines Sequenzabschnittes der Patientenprobe 11003 mit dem Sequenzierungsansatz HBV GT 676 RV KI. Die Nukleotidsequenz aus dem Pyrogramm (antisense) wurde bis zum schwarzen Balken ausgewertet. Bei Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz wurde eine Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) festgestellt.

Bei den Patientenproben aus der Medizinischen Klinik I wurden sowohl bei der Sanger-Sequenzierung als auch bei der Pyrosequenzierung die gleichen drei Mutationen nachgewiesen.

### 3.7 Ergebnisse für Patientenproben aus einem Ringversuch

Bei der Genotypisierung der sieben Patientenproben aus dem QCMD-Ringversuch waren die Ergebnisse bei der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung identisch. Dabei wurden eine Patientenprobe als Genotyp A, eine Patientenprobe als Genotyp B, eine Patientenprobe als Genotyp C, eine Patientenprobe als Genotyp D und zwei Patientenproben als Genotyp G identifiziert. Bei keiner der sieben Patientenproben konnte weder die Sanger-Sequenzierung noch die Pyrosequenzierung eine Resistenzmutation nachweisen (Tab. 3.5).

Tab. 3.5. Übersicht der Ergebnisse der Patientenproben aus dem QCMD-Ringversuch

Proben Nr.	Genotyp	V173L	L180M	A181V/T	M204V/I	N236T
9951	A	--	--	--	--	--
9955	B	--	--	--	--	--
9952	C	--	--	--	--	--
9954	D	--	--	--	--	--
9950	E	--	--	--	--	--
9956	G	--	--	--	--	--
9957	G	--	--	--	--	--

Bei den Patientenproben aus dem Ringversuch wurde weder bei der Sanger-Sequenzierung noch bei der Pyrosequenzierung eine Mutation nachgewiesen.

## 4. Diskussion

Die hier entwickelte Methode der HBV-Pyrosequenzierung ermöglicht die Genotypisierung der acht HBV-Genotypen A bis H im Bereich der HBV-DNA-Polymerase (67, 68, 69, 70). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Resistenz-Mutationen gegen das Nukleosid-Analogon Lamivudin und das Nukleotid-Analogon Adefovir-Dipivoxil in dem sequenzierten Teil der HBV-DNA-Polymerase befinden, ist es zugleich möglich, mit der Genotypisierungs-Methode ggf. vorhandene Resistenz-Mutationen zu bestimmen. Die Resistenz-Mutationen gegen Entecavir sind zum jetzigen Standpunkt sehr selten und für die Resistenzbestimmung noch unbedeutend. Sie konnten deswegen in der Methodenentwicklung noch nicht berücksichtigt werden. Somit steht eine neue, schnelle und günstige Methode zur optimalen Therapieplanung und Therapieüberwachung bei der antiviralen Therapie der chronischen HBV-Infektion zur Verfügung.

Bei der Sequenzierung und Untersuchung der 53 HBV-Proben wurden insgesamt 16 Patientenproben als Genotyp A, eine Patientenprobe als Genotyp B, zwei Patientenproben als Genotyp C, 26 Patientenproben als Genotyp D, fünf Patientenproben als Genotyp E und zwei Patientenproben als Genotyp G identifiziert. Als häufigste Genotypen stellen sich somit die Genotypen A und D heraus. Die anderen Genotypen kommen seltener oder überhaupt nicht vor. Dies stimmt mit der bekannten weltweiten Verteilung der HBV-Genotypen überein (69, 70, 71, 72).

Bei HBV treten jedoch gelegentlich Chimären auf, also Rekombinanten aus zwei oder mehr Genotypen von HBV. Nur durch die Genotypisierung des kompletten HBV-Genoms kann man diese Chimären erfassen. Aufgrund der Sequenzierung und Analyse ausschließlich eines Teils der HBV-DNA-Polymerase wird lediglich der Genotyp des sequenzierten Bereichs erfasst. Möglicherweise vorliegende genotypische Chimären können dabei nicht erkannt werden.

Bei den vorhandenen Resistenz-Mutationen der 53 untersuchten Patientenproben wurden bei vier Proben insgesamt drei Resistenz-Mutationen gegen Lamivudin und drei Virus-Fitness-Mutationen nachgewiesen. Bei den Resistenz-Mutationen gegen Lamivudin handelt es sich bei zwei Patientenproben um die Mutation von Methionin zu Valin an Position 204 (rtM204V) und bei einer Patientenprobe um eine Mutation

von Methionin zu Isoleucin an Position 204 (rtM204I) (56, 57, 58). Diese drei Patientenproben wurden alle als Genotyp A identifiziert. Das korreliert mit der Beobachtung, dass der Genotyp A häufiger Resistenzmutationen gegen Lamivudin entwickelt als der Genotyp D (75,76).

Die Virus-Fitness-Mutationen wurden bei drei Patientenproben nachgewiesen. Dabei handelt es sich um die Mutation von Leucin zu Methionin an Position 180 (rtL180M) (61). Bei zwei Patientenproben traten die Lamivudin-Resistenz-Mutationen zusammen mit einer kompensatorischen Virus-Fitness-Mutation auf. Bei den anderen beiden Patientenproben kommen die Lamivudin-Resistenz-Mutation und die Virus-Fitness-Mutation einzeln vor. Eine Resistenz-Mutation gegen Adefovir-Dipivoxil wurde bei den Patientenproben nicht nachgewiesen. Diese tritt im Vergleich mit einer Resistenz-Mutation gegen Lamivudin auch seltener auf (54,55).

#### **4.1 Auswertung**

Zur optimalen, automatisierten Auswertung der Pyrogramme sollten die Nukleotid-Peaks in den Pyrogrammen eine Signalstärke von 40 bis 60 aufweisen. Die Nukleotid-Peaks in den Pyrogrammen der drei Versuchsreihen hatten aber eine Signalstärke von nur 5 bis 15. Aufgrund dessen hatte die Identifire<sup>®</sup>-Software gelegentlich Probleme beim Auswerten der gewonnenen Sequenzen. Die Software konnte dann nicht erkennen, für wie viele wiederholte Basen ein einzelner Nukleotid-Peak steht. Somit kam es durch fehlerhafte Auswertung zu Insertionen oder Deletionen einzelner Basen. Diese Fehler traten vor allem im hinteren Bereich der Sequenz auf und selten auch im vorderen Bereich der Sequenz, in dem sich die Resistenz-Mutationen befinden. In diesem Fall musste die Sequenz manuell ausgewertet werden.

Zur Verstärkung der Signalstärke der Nukleotid-Peaks wurde einerseits versucht, die Menge der Einzelstrang-DNA, die als Matrize für die Sequenzierreaktion zur Verfügung steht, zu erhöhen. Dazu wurde die Menge des PCR-Produktes von 10 µl auf 40 µl sowie die Menge der Streptavidin-Sepharose von 3 µl auf 5 µl erhöht. Somit konnte bei der Einzelstrangpräparation (2.6 Pyrosequenzierung) mehr Einzelstrang-DNA gewonnen werden. Als weiterer Schritt wurde versucht, die Anzahl der Primer zu erhöhen, die an die Einzelstrang-DNA binden. Dazu wurden die Primer-Konzentratio-

nen sowie die Anlagerungs-Temperatur von 70°C auf 80°C erhöht. Durch diese Maßnahmen konnte aber die Signalstärke der Nukleotid-Peaks noch nicht erhöht werden.

Zur Vereinfachung und Optimierung der Auswertung der Pyrogramme wurde vom Institut für Informatik der Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ein automatisches Auswertungstool entworfen und programmiert. Dieses wertet die gewonnenen Sequenzen aus und stellt automatisch den Genotyp und die möglichen Resistenz-Mutationen dar.

#### **4.2 Sequenzierstrategien im Vergleich**

Bei der Sequenzierung und Untersuchung der 53 Patientenproben war die Pyrosequenzierung genauso sensitiv wie die Sanger-Sequenzierung. Bei beiden Methoden wurden die gleichen Genotypen und Resistenz-Mutationen nachgewiesen.

Die Pyrosequenzierung ist schneller als die Sanger-Sequenzierung. Dies wird zum einen bei der DNA-Aufbereitung deutlich. Bei der Sanger-Sequenzierung müssen die PCR-Produkte aus der zweiten PCR in einem Aufreinigungsprozess für die Cycle-Sequenzierung aufbereitet werden. Nach der Cycle-Sequenzierung werden die gewonnenen Sequenzierprodukte für die Kapillarelektrophorese erneut aufgereinigt (2.5 Sanger-Sequenzierung). Erst jetzt kann die DNA im ABI Prism 310 Genetic Analyzer analysiert werden. Bei der Pyrosequenzierung entfällt der ganze Aufreinigungsprozess. Es erfolgt einzig die Präparation der Amplifikate (2.6 Pyrosequenzierung).

Ein weiterer Punkt ist die Geschwindigkeit der DNA-Sequenzierung. Der ABI Prism 310 Genetic Analyzer kann nur eine Probe zur gleichen Zeit sequenzieren. Für die DNA-Polymerase-Fragmente von ca. 800 bp benötigt er ca. drei bis vier Stunden. Da für die Auswertung der Sequenz der Sense- sowie der Antisense-Strang sequenziert werden muss, benötigt der ABI Prism 310 Genetic Analyzer ca. sieben bis acht Stunden allein für die Sequenzierung. Der PyroMark ID hingegen kann 96 Proben parallel sequenzieren. Für die DNA-Polymerase-Fragmente von 60 bis 100 bp benötigt er ca. eine Stunde. Da für die Auswertung nur der Antisense-Strang benötigt wird und pro

Patient vier Proben sequenziert werden müssen, sequenziert der PyroMark ID die HBV-DNA von 24 Patienten zur gleichen Zeit und in nur einer Stunde.

Mit der Sanger-Sequenzierung gewinnt man DNA-Sequenzen mit einer Länge von maximal ca. 1000 bp. Da der DNA-Abschnitt der HBV-DNA-Polymerase ca. 800 bp umfasst, reicht eine Sequenz aus, den Genotyp und alle Resistenz-Mutationen nachweisen zu können. Mit der Pyrosequenzierung können Sequenzen nur mit einer Länge von bis zu 100 bp erstellt werden. Zur Genotypisierung reicht jedoch ein kleiner Bereich der HBV-DNA-Polymerase aus, der ausreichend viele Genotyp-spezifische Polymorphismen aufweist. Die Resistenz-Mutationen gegen Lamivudin und Adefovir-Dipivoxil sind Punktmutationen an bekannten Stellen der DNA-Polymerase. Somit reicht die Sequenzierung von vier kurzen Sequenzen zur Bestimmung der Genotypen und der Resistenz-Mutationen völlig aus.

Die Pyrosequenzierung hat sich im Vergleich mit der Sanger-Sequenzierung als kostengünstigere Methode herausgestellt. Durch die einfachere Aufbereitung der DNA bei der Pyrosequenzierung und die Möglichkeit, 96 Proben parallel zu analysieren, werden weniger Ressourcen und Arbeitskraft benötigt. Auch die Reagenzien zur Aufbereitung und Sequenzierung der DNA haben sich bei der Pyrosequenzierung als kostengünstiger erwiesen. Pro Patientenprobe werden die Kosten für Reagenzien bei der Sanger-Sequenzierung (zwei Reaktionen) mit ca. 10 € und bei der Pyrosequenzierung (vier Reaktionen) mit ca. 4 € aktuell angegeben. Bei einer Leselänge von maximal 100 bp ist die Pyrosequenzierung pro Base zwar teurer als die Sanger-Sequenzierung; in anbetracht der geringen benötigten Leseweite ist dies aber dennoch preisgünstiger.

### **4.3 Klinische Relevanz**

Aufgrund der bei längerer Therapiedauer ansteigenden Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Resistenz-Mutation gegen ein Nukleosid- oder Nukleotid-Analogon wie Lamivudin oder Adefovir-Dipivoxil (54, 55) kann es zu einem Therapieversagen kommen. Ebenso kann es bei einer Infektion mit einem HBV mit bereits vorhandener Resistenz-Mutation zu einem primären Nicht-Ansprechen auf eine antivirale Therapie kommen. Ein Hinweis auf eine Resistenz-Mutation bei bestehender antiviraler Thera-

pie ist der Wiederanstieg der Transaminasen-Werte sowie der Viruslast im Plasma. Die Resistenz-Mutation tritt dabei einige Monate vor dem Anstieg der Transaminasen-Werte und der HBV-DNA auf. Bei einer primären antiviralen Therapie weist die fehlende Reduktion der Viruslast auf eine bestehende Resistenz-Mutation hin. Der Nachweis einer Resistenz-Mutation und somit der Ursache des Misserfolges der antiviralen Therapie kann jedoch nur durch die Sequenzierung der HBV-DNA-Polymerase und der anschließenden Resistenzbestimmung erbracht werden (87). Mit der Pyrosequenzierung als neue, schnelle und günstige Methode besteht die Möglichkeit, die Resistenz-Mutationen suffizient zu bestimmen. Dadurch ist die Voraussetzung gegeben, eine optimale Therapieplanung oder einen gezielten Therapiewechsel auf ein anderes antivirales Medikament durchzuführen. Dies ist dringend erforderlich, da die Sekundärtherapie umso schlechter anspricht, je intensiver die erneute HBV-Replikation stattfindet (88).

Der Genotyp des HBV spielt bei Resistenz-Mutationen eine untergeordnete Rolle. Zwar wurde gezeigt, dass bei einer antiviralen Therapie mit Lamivudin häufiger Resistenzen bei Patienten mit Genotyp A als mit Genotyp D auftreten (75, 76); den größten klinischen Nutzen spielt die Genotypisierung jedoch bei der antiviralen Therapie mit IFN- $\alpha$ . Die Genotypen C und D haben schlechtere Ansprechraten auf eine Therapie mit IFN- $\alpha$  als Genotyp B und A (79, 81, 78, 89). Daher sollte vor Beginn einer solchen Therapie eine einmalige Genotyp-Bestimmung erfolgen.

#### 4.4 Ausblick

Aktuell sind Resistenz-Mutationen der HBV-DNA-Polymerase für Lamivudin (rtM204V/I), für Adefovir Dipivoxil (rtA181V/T, rtN236T) sowie die beiden kompensatorischen Mutationen für die Virus-Fitness (rtV173L, rtL180M) relevant für die optimale antivirale Therapie (56, 57, 58, 61, 62, 63, 64). Die drei Resistenzmutationen gegen Entecavir (rtT184/GS, rtS202I, rtM250V) sind zum jetzigen Standpunkt sehr selten (47) und für die Resistenzbestimmung noch unbedeutend. Durch die längere Therapiedauer mit Lamivudin oder Adefovir-Dipivoxil und den häufigeren Einsatz von neuen Nukleosidanaloga wie Entecavir ist die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung neuer therapierelevanter Resistenz-Mutationen der HBV-DNA-Polymerase erhöht. Die Pyrosequenzierung ist eine variable Methode, neue Resistenzmutationen zu er-

fassen. Einerseits können auch neuartige Resistenzmutation innerhalb der Region der bekannten fünf Resistenzmutationen durch diese Methode erfasst werden. Sollte eine neuartige Resistenz-Mutation nicht in dem bereits erfassten Bereich liegen, könnte sie durch die gezielte Auswahl weiterer Amplifikations- und Sequenzier-Primer untersucht werden.

Eine Weiterentwicklung der Pyrosequenzierung ist die sogenannte 454-Sequenzierungs-Technologie. Dabei handelt es sich um eine Sequenzierungsmethode im Hochdurchsatz-Bereich, die es ermöglicht, bis zu ca. 25 Millionen bp in vier Stunden zu sequenzieren. Die Methode beruht auf der parallelen Sequenzierung über bis zu 400 bp mit der Pyrosequenzierung (90). Mit dieser Methode wäre es möglich, das komplette HBV-Genom in kürzester Zeit zu sequenzieren und somit neben den Resistenz-Mutationen auch die Chimären zu erfassen. Obwohl die Kosten pro sequenzierte Base relativ gering sind, ist die Methode noch kostspielig und eignet sich nur für die Sequenzierung sehr langer oder sehr vieler Genome. Da das HBV-Genom lediglich ca. 3,2 kb umfasst, wäre die Verwendung dieser Methode in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll.

Die Genotypisierung und Resistenzbestimmung des HBV durch Pyrosequenzierung wurde an Patientenproben und durch den QCMD-Ringversuch erfolgreich validiert. Sie wurde im Institut für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel als Routinediagnostik eingeführt. Hierfür wurden Standardarbeitsanleitungen ausgearbeitet und die Mitarbeiter wurden in die neue Methode eingewiesen. Auch wenn die aktuellen Therapierichtlinien den raschen Abfall der Viruslast als wesentliches diagnostisches Kriterium einstufen (39), kommt der Resistenzdiagnostik wieder ein erhöhter Stellenwert zu, sobald die Entecavir-Resistenz häufiger auftreten wird.

## 5. Zusammenfassung

Die Hepatitis B ist mit weltweit 320-400 Millionen chronisch-aktiv infizierten Menschen die häufigste Viruserkrankung. Die chronische HBV-Infektion kann zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom führen. Durch eine Therapie chronisch infizierter Patienten mit IFN- $\alpha$  sowie den Nukleosidanaloga Lamivudin, Adefovir-Dipivoxil oder Entecavir soll die Virusreplikation blockiert und damit die Häufigkeit der Spätfolgen reduziert werden. Die Kenntnis des HBV-Genotyps sowie bekannter Resistenz-Mutationen des Virusgenoms spielt eine große Rolle für eine erfolgreiche antivirale Therapie. Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Routinediagnostik-Methode für die gleichzeitige Genotypisierung und Resistenzbestimmung von HBV zu etablieren. Dabei sollte die Technik der Pyrosequenzierung zum Einsatz kommen. Diese ermöglicht die Sequenzierung von kurzen Abschnitten von bis zu 100 Basenpaaren in Echtzeit und ist eine preisgünstige Alternative zur Sanger-Sequenzierung.

Bei insgesamt 53 Patientenproben wurde ein Abschnitt der HBV-DNA-Polymerase durch Pyrosequenzierung und Sanger-Sequenzierung analysiert. Daraufhin wurden die Patientenproben genotypisiert und auf die bekannten Mutationen der Polymerase für Lamivudin- (rtM204V/I) und für Adefovir-Resistenz (rtA181V/T, rtN236T) sowie den kompensatorischen Mutationen für die Virus-Fitness (rtV173L, rtL180M) hin untersucht. Die Ergebnisse beider Methoden waren identisch. Parallel wurde eine Datenbank aus ca. 500 publizierten HBV-Sequenzen, vorrangig der Genotypen A und D, aufgebaut und mit dem NCBI-Algorithmus klassifiziert. Diese Datenbank diente der Auswertung der Sequenzen aus den Patientenproben.

Die Pyrosequenzierung war also für die Bestimmung des Genotyps und der Resistenz-Mutationen genauso sensitiv wie die Sanger-Sequenzierung. Die Methode wurde schließlich im QCMD-Ringversuch validiert und steht der Routinediagnostik zur Verfügung.

## Summary

Hepatitis B is with worldwide 320-400 million chronically and actively infected people the most common viral disease. The chronic HBV infection can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The therapy of chronically infected patients with IFN- $\alpha$  and the nucleoside analogues Lamivudine, Adefovir dipivoxil or Entecavir aims at blocking viral replication and reducing the rate of late complications. The knowledge of the HBV genotype and of defined resistance mutations in the viral genome plays a major role for the successful antiviral therapy. This project aimed at establishing a new method for routine diagnostics for the genotyping and determination of HBV resistance in parallel. The technique of pyrosequencing should be applied. This technique allows the sequencing of short segments of up to 100 base pairs in real time and is a low priced alternative to Sanger sequencing.

In a total of 53 patient samples a region of the HBV DNA polymerase was analyzed by pyrosequencing and Sanger sequencing. Subsequently, the patient samples were genotyped and investigated for the defined major mutations of the polymerase for resistance to lamivudine (rtM204V/I) and adefovir (rtA181V/T, rtN236T) and compensatory mutations for viral fitness (rtV173L, rtL180M). The results of both methods were identical. In parallel, a database of approximately 500 published HBV sequences of mainly genotypes A and D was established and classified with the NCBI algorithm. This database was used to evaluate the sequences from the patient samples.

Thus, pyrosequencing was as sensitive as Sanger sequencing for the determination of the genotype and of the resistance mutations. Finally, the method was validated in the QCMD external quality assessment test and is now available in the routine diagnostic.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Anti-HBs-Titer	Anti-Hepatitis-B-Surface-Titer
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
ccc-DNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA (covalently closed circular DNA)
CCD-Kamera	Charge Coupled Device-Kamera
D	Asparaginsäure
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
G	Guanin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen (Hepatitis-B-Core-Protein)
HBsAg	Hepatitis-B-Surface-Antigen (Hepatitis-B-Surface-Protein)
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen (Hepatitis-B exkretorisches Antigen)
HBxAg	Hepatitis-B-x-Antigen (Hepatitis-B x-Protein)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
K	Guanin oder Thymin
kb	Kilobasenpaare
M	Methionin
M	Molar

mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
N	normal
N	Guanin oder Adenin oder Thymin oder Cytosin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pi	Phosphat
PPi	Pyrophosphat
QCMD	Quality Control for Molecular Diagnostics
R	Adenin oder Guanin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
STIKO	Ständige Impfkommission
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
U	Units
Y	Thymin oder Cytosin
Y	Tyrosin
YMDD-Motiv	Tyrosin-Methionin-Asparaginsäure-Asparaginsäure-Motiv

## 7. Literaturverzeichnis

1. Kane MA (1998) World-wide epidemiology of hepatitis B. *Soz Präventivmed* 43 Suppl 1: 24-6, 98-100
2. Maddrey WC (2000) Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 61: 362-366
3. Epidemiologisches Bulletin Nr. 49 des Robert-Koch Instituts (2007) Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2006
4. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 45: 529-538
5. Lavanchy D (2004) Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 11: 97-107
6. World Health Organisation (2002) Hepatitis B. [http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB\\_whocdscsrlyo2002\\_2.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf)
7. Van Regenmortel MH, Bishop DH, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH (1997) Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol* 142: 1505-1518
8. Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1: 695-698
9. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ (1971) New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2: 1225-1227
10. Summers J, O'Connell A, Millman I (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4597-4601

11. Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 21: 666-672
12. Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* 23: 368-376
13. Sattler F, Robinson WS (1979) Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 32: 226-233
14. Charnay P, Pourcel C, Louise A, Fritsch A, Tiollais P (1979) Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2222-2226
15. Kann M, Gerlich W H (2005) Hepadnaviridae, Structure and Molecular Biology. In: Zuckerman A J, Thomas K C, Lemon S M (Hrsg.), *Viral Hepatitis*, Blackwell Publ., 149-173
16. Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H (1988) The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 166: 475-485
17. Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G, Murray K (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282:575-579
18. Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 280: 815-819
19. Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ (1988) A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8405-8409

20. Lian Z, Liu J, Pan J, Satiroglu Tufan NL, Zhu M, Arbuthnot P, Kew M, Clayton MM, Feitelson MA (2001) A cellular gene up-regulated by hepatitis B virus-encoded X antigen promotes hepatocellular growth and survival. *Hepatology* 34: 146-157
21. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K (1986) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46: 429-436
22. Neurath AR, Strick N, Sproul P (1992) Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 175: 461-469
23. De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A, Ruvo M, Raucci A, Marino M, Senatore S, Cassani G, Alberti A, Pontisso P, Fassina G (2001) Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem* 276: 36613-36623
24. Kann M, Schmitz A, Rabe B (2007) Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 13: 39-47
25. Köck J, Schlicht HJ (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity *J Virol* 67: 4867-4874
26. Bock CT, Schranz P, Schröder CH, Zentgraf H (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 8: 215-229
27. Seeger C, Ganem D, Varmus HE (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232: 477-484
28. Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403-415
29. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J (1986) Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47: 451-460

30. Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS (1990) In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175: 255-261
31. Blum HE, Gerok W, Vyas G (1989) The molecular biology of hepatitis B virus. *Trends Genet* 5: 154-158
32. Barker LF, Murray R (1972) Relationship of virus dose to incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen. *Am J Med Sci* 263: 27-33
33. Chisari FV, Ferrari C (1995) Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 17: 261-281
34. Epidemiologisches Bulletin Nr. 30 des Robert-Koch Instituts (2007) Mitteilung der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut: Empfehlung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut, Stand: Juli 2007
35. Epidemiologisches Bulletin Nr. 31 des Robert-Koch Instituts (2007) Mitteilung der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut: Neuerungen in den aktuellen Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am RKI vom Juli 2007
36. Kumar M, Satapathy S, Monga R, Das K, Hissar S, Pande C, Sharma BC, Sarin SK (2007) A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology* 45: 97-101
37. Kondili LA, Osman H, Mutimer D (2004) The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases). *J Viral Hepat* 11: 427-431
38. Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, Zachou K, Canbay A, Eisenbach C, Graziadei I, Encke J, Schmidt H, Vogel W, Schneider A, Spengler U, Gerken G, Dalekos GN, Wedemeyer H, Manns MP (2006) Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat* 13: 256-263

39. Cornberg M, Protzer U, Dollinger MM, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Schirmacher P, Fleig WE, Manns MP (2007) Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection. *Z Gastroenterol* 45: 1281-1328
40. Pestka S (2007) The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282: 20047-20051
41. Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, Spence CL, Fung WJ, Porter JE, Ehrlich GK, Pan W, Xu ZX, Modi MW, Farid A, Berthold W, Graves M (2001) Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem* 12: 195-202
42. Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N (2003) Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 10: 298-305
43. Severini A, Liu XY, Wilson JS, Tyrrell DL (1995) Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1430-1435
44. Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonno R, Apelian D; BEHoLD A1463022 Study Group (2006) A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 354: 1001-1010
45. Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, DeHertogh D, Wilber R, Zink RC, Cross A, Colonno R, Fernandes L; BEHoLD A1463027 Study Group (2006) Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 354: 1011-1020
46. Dienstag JL, Wei LJ, Xu D, Kreter B (2007) Cross-study analysis of the relative efficacies of oral antiviral therapies for chronic hepatitis B infection in nucleoside-naive patients. *Clin Drug Investig* 27: 35-49

47. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Xu D, Yang J, Wilber RB, Colonno RJ (2009) Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 49: 1503-1514.
48. Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF (1998) A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 339: 61-68
49. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA (1999) Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 341: 1256-1263
50. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group (2003) Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 348: 800-807
51. Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 437 Study Group (2003) Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 348: 808-816
52. Gish RG, Lok AS, Chang TT, de Man RA, Gadano A, Sollano J, Han KH, Chao YC, Lee SD, Harris M, Yang J, Colonno R, Brett-Smith H (2007) Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 133: 1437-1444
53. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, Helm M, Rockstroh JK, Willems WR, Will H, Gerlich WH (2006) Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 354: 1807-1812

54. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L (2003) Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 36: 687-696
55. 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* 131: 1743-1751
56. Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA (1997) Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 349: 20-22
57. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ (1996) Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 24: 711-713
58. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD (1998) Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 27: 1670-1677
59. Heipertz RA Jr, Miller TG, Kelley CM, Delaney WE 4th, Locarnini SA, Isom HC (2007) In vitro study of the effects of precore and lamivudine-resistant mutations on hepatitis B virus replication. *J Virol* 81: 3068-3076
60. Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carrilho FJ, Omata M (1999) YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 29: 939-945

61. Li MW, Hou W, Wo JE, Liu KZ (2005) Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 664-667
62. Delaney WE 4th, Yang H, Westland CE, Das K, Arnold E, Gibbs CS, Miller MD, Xiong S (2003) The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* 77: 11833-11841
63. 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: 292-297
64. 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. *N Engl J Med* 352: 2673-2681
65. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Levine SM, Pokornowski KA, Walsh AW, Fang J, Yu CF, Zhang S, Mazzucco CE, Eggers B, Hsu M, Plym MJ, Poundstone P, Yang J, Colonno RJ (2007) Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 902-911
66. Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Warner N, Locarnini S, Colonno RJ (2004) Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3498-34507
67. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1988) Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69: 2575-2583

68. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO (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: 489-503
69. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R (2000) A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 81: 67-74
70. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO (2002) Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83: 2059-2073
71. Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnius LO (1992) Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73: 1201-1208
72. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, Magnius LO (1993) Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 74: 1341-1348
73. Campos RH, Mbayed VA, Pineiro Y, Leone FG (2005) Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol* 34: 8-13
74. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC (1999) Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 6: 299-304
75. Zöllner B, Petersen J, Schröter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH (2001) 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 357: 934-935
76. Zöllner B, Petersen J, Schäfer P, Schröter M, Laufs R, Sterneck M, Feucht HH (2002) Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis* 34: 1273-1277

77. Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D (2005) Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 54: 1009-1013
78. Ma JC, Wang LW, Li XJ, Liao YF, Hu XY, Gong ZJ (2007) Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int* 6: 166-171
79. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS (2002) HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 36: 1425-1430
80. Tsubota A, Arase Y, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H (2001) Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 65: 257-265
81. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (2000) Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118: 554-559
82. Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL (2003) Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 37: 562-567
83. Yuen MF, Fung SK, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL (2004) Longitudinal study of hepatitis activity and viral replication before and after HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients infected with genotypes B and C. *J Clin Microbiol* 42: 5036-5040
84. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
85. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

86. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242: 84-89
87. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky JM, Zoulim F (2004) Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 9: 679-693
88. Lampertico P, Viganò M, Manenti E, Iavarone M, Lunghi G, Colombo M (2005) Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology* 42: 1414-1419
89. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL (2008) Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther* 13: 211-220
90. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380

## 8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher, dem Direktor des Instituts für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, und für die Hilfe bei der endgültigen Gestaltung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Karsten Tischer für die stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, für die Anregungen zur Lösung von Problemen, für das Korrekturlesen und für die vielen wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche.

Ich bedanke mich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen aus dem PCR-Labor vor allem aber bei Helga Janecek für das Einarbeiten, für die Hilfe und Geduld bei meiner Einführung in die Methoden und bei meiner Durchführung der praktischen Arbeiten.

Ich danke Dr. med. Rainer Günther für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Patientenproben.

Mein Dank gilt der gemeinnützigen Gesellschaft zur Förderung der Forschung in der Infektionsmedizin in Kiel gGmbH durch die mir die Arbeit erleichtert wurde.

Vielen Dank an Franziska Grohmann aus dem Institut für Informatik der Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für den Entwurf und die Programmierung eines automatischen Auswertungstools.

Vor allem danke ich meinen Eltern, Anna und Leszek Rybarkiewicz, dass sie mir das Studium und somit das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Zimmermann, geb. Rybarkiewicz, Paul Leszek  
 Anschrift: Gutenbergstraße 28, 24118 Kiel  
 Geburtsdatum: 15.07.1982  
 Geburtsort: Thorn/Polen  
 Familienstand: ledig

### Veröffentlichung

Tischer BK, **Rybarkiewicz P**, Günther R, Fickenscher H (2008) Detection of hepatitis B virus genotype and resistance associated mutations using pyrosequencing. Abstract IDM11. 18<sup>th</sup> Annual meeting of the Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 05.-08.03.2008.

### Studium und Berufserfahrung

seit 2010 Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster GmbH  
 seit 2007 Dissertation im Institut für Infektionsmedizin der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
 Promotionsstipendiat der gemeinnützigen Gesellschaft zur Förderung der Forschung in der Infektionsmedizin in Kiel gGmbH  
 2003-2009 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Wehrdienst

2002 – 2003 11-monatiger Wehrdienst in Nienburg/Weser und Wehrbereichskommando I „Küste“ in Kiel

### Schulische Daten

1999 – 2002 Walther-Lehmkuhl-Schule Neumünster, Fachgymnasium  
 1995 – 1999 Wilhelm-Tanck-Schule Neumünster, Realschule  
 1993 – 1995 Klaus-Groth-Schule Neumünster, Gymnasium  
 1992 – 1993 Wippendorfschule Neumünster, Grundschule  
 1989 – 1992 Grundschule Nortorf