

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
IUB-Code	12
Internationales Abkürzungsverzeichnis für Aminosäuren	12
1 Einleitung	13
1.1 Geschichte des Hepatitis-B-Virus	13
1.2 Das Hepatitis-B-Virus (HBV), sein Genom und dessen Produkte	13
1.2.1 Das Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg)	15
1.2.2 Die Polymerase	16
1.3 Der Replikationszyklus	16
1.4 HBV-Diagnostik	18
1.4.1 Immun- und Detektions-Escape	19
1.5 Infektionsverlauf und assoziierte Erkrankungen	20
1.5.1 Infektionsverlauf	20
1.5.2 Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC)	21
1.6 Therapie der Hepatitis-B-Infektion	21
1.6.1 Resistenz	23
1.7 Ziel der Arbeit	26
2 Material	27
2.1 Bakterienstämme	27
2.2 Zelllinien	27
2.3 Patientencharakteristika	27
2.4 Nukleinsäuren	27
2.4.1 Synthetische Oligonukleotide	27
2.4.2 Plasmide	32
2.4.3 DNA-Marker und Loading Dyes	33
2.5 Enzyme	34
2.6 Reagenzien	34
2.6.1 Reagenziensysteme	34
2.6.2 Puffer und Lösungen	36
2.6.3 Sonstige Chemikalien	36
2.7 Medien	38
2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial	39
2.9 Benutzte Software	40
2.10 Hilfsmittel im Internet	40
3 Methoden	41
3.1 DNA-Methoden	41
3.1.1 Isolierung viraler DNA	41
3.1.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	42

3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.1.4	Quantifizierung der DNA	46
3.1.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	46
3.1.6	Sequenzierreaktion	47
3.1.7	Aufreinigung der Sequenzprodukte	49
3.1.8	Sequenzierung mit dem 3130xl Genetic Analyzer	50
3.1.9	Methoden zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten	50
3.1.10	Plasmidpräparationen	51
3.1.11	In vitro Mutagenese	52
3.1.12	DNA-Standardmethoden	53
3.2	Bakterienkultur	54
3.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	54
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	54
3.2.3	Langzeitlagerung von Bakterien	54
3.2.4	Kulturen zur Plasmidisolierung	54
3.2.5	Klonale Analyse	55
3.3	Expression von HBsAg in Huh7	55
3.3.1	Konstruktion der Plasmide	55
3.3.2	Zellkultivierung	55
3.3.3	Transiente Transfektion der HuH7-Zellen mittels FugeneHD	56
3.3.4	Ernte der transfizierten Zellen	56
3.3.5	Messung des HBsAg	56
3.4	Durchflusszytometrie	57
3.4.1	Apoptosemessungen – Annexin V FITC	57
3.4.2	Zellproliferationsmessungen – Click-iT® EdU Pacific Blue™ Flow Cytometry Assay Kit	59
3.5	DNA Degradations-Assay	60
3.6	Phänotypischer In-vitro-Resistenz-Assay	60
3.6.1	Herstellung rekombinanter HBV-Plasmide	61
3.6.2	Zellkultur – phänotypischer Assay	61
3.6.3	Aufreinigung der Überstände mit Freedom Evo 100/4D	62
3.6.4	Quantitative Bestimmung der Genomequivalente durch qRT-PCR	62
3.6.5	Berechnung der Resistenzfaktoren (RF)	64
3.7	Statistische Analysen	66
4	Ergebnisse	67

4.1 Resistenzmutationsmuster in HBV-Isolaten	67
4.1.1 Mutationsmuster in der Reversen Transkriptase resistenter HBV-Isolate	67
4.1.2 Mutationsmuster im HBsAg resistenter HBV-Isolate	68
4.1.3 Klonale Analyse der HBV-Quasispezies der Isolate mit mindestens einem Stopcodon im HBsAg	70
4.2 RT-Mutanten – Phänotypischer Resistenztest ausgewählter Isolate	73
4.2.1 Herstellung rekombinanter Plasmide	73
4.2.2 Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen	73
4.3 HBsAg-Mutanten	78
4.3.1 Quantifizierung von HBsAg-Mutanten im Vergleich zweier Detektionssysteme	78
4.3.2 Untersuchung der Sekretionsfähigkeit der Stopcodon-Mutanten	80
4.3.3 Quantifizierung der Überstände von mit HCC korrelierten HBsAg-Mutanten	84
4.3.4 Untersuchungen zum pathogenen Einfluss der Stopcodon-Mutanten	86
5 Diskussion	91
6 Literaturverzeichnis	99
7 Zusammenfassung	105
8 Abstract	107
9 Danksagung	109
10 Erklärung	111