

**Einfluss von Mutationen im Bereich der überlappenden Leserahmen für Polymerase und
Oberflächenprotein des Hepatitis-B-Virus auf die Funktionalität beider Proteine**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Maria Katharina Neumann-Fraune

aus Höxter

Zusammenfassung

Weltweit sind etwa 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert. Neben Interferon-alpha stehen zur Behandlung Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTI) zur Verfügung, die jedoch zur Selektion von RTI-resistenten Varianten führen können. Neben resistenzvermittelnden Mutationen tritt auch eine Reihe kompensatorischer Mutationen auf, die die enzymatische Aktivität der resistenten Reversen Transkriptase aufrechterhalten. Aufgrund der überlappenden Leserahmen der RT und des HBsAg führen Mutationen häufig zu Veränderungen in beiden Proteinen.

Bei der Analyse von 60 resistenten HBV-Isolaten wurde eine Vielzahl von zusätzlichen Polymerasemutationen gefunden, die mit unterschiedlichen Veränderungen des HBsAg assoziiert waren. Neben Mutationen des HBsAg, die mit Immun-Escape assoziiert werden konnten, fanden sich auch Stopcodons im HBsAg-Leserahmen, so dass trunkierte HBsAg gebildet werden. Die genaue Verteilung der detektierten Stopcodon-Mutationen wurde mittels klonaler Analyse aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass Stopcodon-Mutanten auch als dominante virale Population vorkamen, aber ausschließlich in Kombination mit Wildtyp-Varianten auftauchten. Diese Beobachtungen und der Nachweis von vorher mittels Populationssequenzierung nicht detektierten zusätzlichen Stopcodon-Mutationen weisen darauf hin, dass die Populationssequenzierung für die detaillierte Analyse von Quasispezies ungeeignet ist und durch Next-Generation-Sequencing-Technologien ersetzt werden sollte.

Der phänotypische in vitro Assay konnte die Bedeutung der beschriebenen Resistenzmutationen bestätigen und zusätzlich eine messbare Kreuzresistenz nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht beschriebene Mutationen, wie solche an resistenzassoziierten Positionen oder durch Therapie selektierte, in manchen Fällen die RF-Höhe modulieren konnten.

Durch die Untersuchung des Sekretionsverhaltens verschiedener HBsAg-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Retention von Stopcodon-Mutanten signifikant war. Neben den Stopcodon-Mutanten konnte auch für weitere Mutanten, die im Vorfeld mit einem HCC korreliert werden konnten, eine verminderte oder erhöhte Sekretion nachgewiesen werden. Weitere Analysen zur Bedeutung der HBsAg-Mutanten mittels Durchflusszytometrie ergaben weder Unterschiede in der Induktion von Apoptose noch der Proliferation, die beide Einfluss auf die Entstehung des HCC haben könnten.

Dass die Veränderungen in den überlappenden Leserahmen der RT und des HBsAg einen Einfluss auf die Funktionalität beider Proteine haben, konnte durch die Untersuchung der korrespondierenden Mutationen gezeigt werden.

Abstract

About 350 million people worldwide are chronically infected with the Hepatitis B Virus (HBV). Besides interferon-alpha, reverse transcriptase inhibitors (RTI) can be used to treat an infection, but they also select for resistant variants. In addition to resistance mutations, compensatory mutations which sustain the enzymatic activity of the reverse transcriptase can be detected. Because of the overlapping reading frames of the RT and HBsAg, one mutation can lead to changes in both proteins.

The analyses of 60 resistant HBV isolates revealed a multiplicity of additional polymerase mutations which were associated with different changes in the HBsAg reading frame. Besides HBsAg mutations associated to immune escape, stop codon mutations could be detected. Stop codon mutations lead to the expression of truncated HBsAg. The detailed distribution of the stop codon mutations was clarified by clonal analyses. It could be shown that mutants carrying stop codons could also form the dominant viral population within one quasi species, but only appeared in combination with wild type variants. These observations and the detection of additional stop codon mutations which could not be detected by population sequencing indicate that population sequencing is unsuitable for detailed analyses of quasi species. Prospectively, it should be replaced by next generation sequencing technologies.

The phenotypic in vitro resistance assay could prove the impact of already known resistance mutations and in addition detect cross resistances. It could be observed that so far unpublished mutations, like those on resistance-associated positions or those selected by therapy, can modulate the resistance factor (RF).

By analysing the secretion characteristics of various HBsAg mutants a significant retention of stop codon mutants could be observed. Along with the stop codon mutants further mutants which previously could be correlated with HCC showed decreased or increased secretion capacity. To acquire further knowledge about the the impact of HBsAg mutants, additional flow cytometry analyses were performed but could not detect any differences in the induction of apoptosis or proliferation of hepatocytes.

By analysing the various corresponding mutations it was proven that mutations in the overlapping reading frames of RT and HBsAg do have an impact on the functionality of both proteins.