

Epidemiologie

Nach Angaben der WHO und des Robert Koch-Instituts (RKI; Berlin) sind derzeit etwa 420 Millionen Menschen, entsprechend 5%-7% der Weltbevölkerung mit HBV infiziert. Pro Jahr wird derzeit von etwa einer Million Todesfälle HBV-infizierter Patienten ausgegangen. In Europa sind zwischen <0,1% (Nordeuropa) und 8% (Ost- und Südeuropa) der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert. In der Bundesrepublik Deutschland wurden im Jahre 2003 2.681 HBV-Neuerkrankungen an das RKI gemeldet, wobei etwa 5% Virusträger bleiben⁴.

Molekularbiologie

Das Hepatitis B Virus ist das kleinste bekannte humanpathogene DNA-Virus und zeigt einen ausgeprägten Zell- (Hepatozyten-) und Speziesotropismus. Die infektiösen, umhüllten HBV-Partikel („Dane-Partikel“) lassen sich elektronenmikroskopisch als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 42-45 nm darstellen (Abb. 1 u. 2). In die äußere Hülle sind die HBV-Oberflächenproteine (HBsAg; „Hepatitis B Virus surface antigen“) eingelagert. Das virale Genom, ein zirkuläres, partiell doppelsträngiges DNA Molekül von ca. 3,2 kb Länge, wird von einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 22-25 nm umgeben (Abb. 1 u. 2). Neben den infektiösen Virionen finden sich im Blut von akut und chronisch HBV-infizierten Patienten in großer Zahl ca. 22 nm große globuläre und filamentöse Partikel, die jedoch keine DNA enthalten und daher nicht infektiös sind (Abb. 1 u. 2). Das im Serum nachweisbare HBeAg („Hepatitis B Virus early antigen“) ist eine sezernierte, posttranslational modifizierte Variante des Kapsidproteins. Die Viruslast im Serum ist bei akuten Infektionen mit mehr als 10^9 viralen Genomen/ml sehr ausgeprägt.

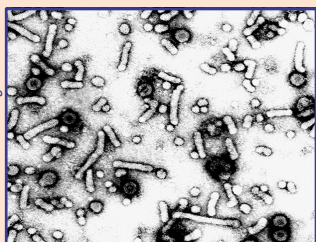


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBV-Partikeln aus dem Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten.

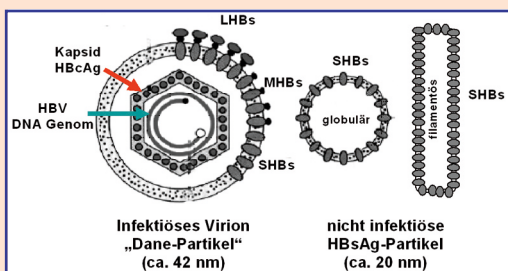


Abb. 2: Schematische Darstellung des infektiösen Hepatitis B Virions (links, Dane-Partikel; LHBs=large HBs, MHBs=middle HBs, SHBs=small HBs) und der im Serum in großer Anzahl auftretenden globulären (mitte) und filamentösen (rechts), nicht infektiösen HBsAg-Partikel.

PD Dr. Thomas Bock, Tübingen

HBV-Resistenz – Aus der Sicht des Virologen

Ein noch ungelöstes Problem bei der Therapie der chronischen Hepatitis B ist die Selektion von Resistenzen unter Nukleos(t)id-Analoga. Eine genotypische Resistenz ist durch die Zunahme spezifischer antiviraler Resistenzmutationen, eine phänotypische Resistenz durch den Anstieg der Viruslast um >1 log-Stufe charakterisiert. Lamivudin selektiert die Resistenzmutation M204I/V im katalytischen Zentrum (YMDD) der HBV-Polymerase, Adefovir die Mutationen N236T und A181V. Die HBV-Resistenzmutationen können sich innerhalb von wenigen Monaten ausbilden, deshalb sollte die Viruslast mittels sensitiver molekularbiologischer Methoden in kurzen Abständen (ca. alle 3 Monate) überprüft und die Therapiestrategie gegebenenfalls angepasst werden.

Für die genetische Variabilität des Hepatitis B Virus (HBV) sind insbesondere zwei Faktoren bedeutsam, die hohe Replikationsrate während der aktiven Vermehrung mit einer „Tagesproduktion“ von mehr als 10 Milliarden Viruskopien sowie das Fehlen einer Lesekorrekturektivität („proof reading“) der HBV Polymerase (Reverse Transkriptase). Dementsprechend entsteht täglich eine Vielzahl von HBV-Quasispezies, d.h. genetisch leicht unterschiedliche HBV-Stämme. Innerhalb dieser Gruppe wird die Virusmutante mit dem größten Selektionsvorteil dominant. Ein solcher Selektionsvorteil ist beispielsweise eine im Vergleich zum Wildtyp-Virus effizientere Replikationskompetenz. Weiterhin kann der Selektionsdruck der Immunantwort des Wirts oder der Selektionsdruck einer antiviralen Therapie bestimmte Virusmutanten gegenüber dem Wildtyp favorisieren. Solche HBV-Mutanten können zu einer Resistenz gegenüber der antiviralen Therapie bzw. zum Diagnostik- sowie Vakzin/Immunglobulin-Escape führen.

So entstehen Mutationen

Die Mutationsrate von HBV liegt bei etwa $1-4 \times 10^{-5}$ Basensubstitutionen/Position/Jahr (BS/P/J). Dieser Wert liegt unter der Fehlerrate, die bei RNA-Viren nachgewiesen werden konnte ($1-2 \times 10^{-5}$ ⁽⁶⁾ BS/P/J)¹⁰, aber deutlich höher als bei anderen DNA-Viren, wie z.B. Herpesviren. Durch die kompakte Anordnung der

sich überlappenden Leserahmen des HBV-Genoms (Abb. 3b) – wobei eine einzige Punktmutation häufig Einfluss auf zwei Leserahmen haben kann – ist nur eine moderate Anzahl von replikationsfähigen HBV-Mutanten zu erwarten, da die meisten Mutationen Replikationsdefizient sind.

Sequenzanalysen viraler Genome chronisch HBV-infizierter Patienten haben gezeigt, dass Mutationen zufällig, aber mit einer Häufung in bestimmten Regionen des Genoms (preC/C und preS/S-Region) auftreten können und es so zur Entstehung von HBV-„Quasispezies“ kommen kann (Abb. 4). Die Selektion bestimmter Mutationen erfolgt dann in Abhängigkeit des Immunstatus des Infizierten, durch Vorteile bei der Virusreplikation und durch Virus-Wirt Interferenzmechanismen¹¹.

Mutationen in der HBV-Polymerasegenregion

Der Polymerase Leserahmen ist der längste der kodierenden Regionen im HBV-Genom. Nahezu 80% der HBV-Sequenzen kodieren für das HBV-Polymerasegen, wobei die Polymerase-Sequenzen mit den drei anderen HBV-Leserahmen Core, preS/S und X überlappen (Abb. 3b). Etwa 75% der Polymerase-Sequenzen zeigen Homologien zu einer Reversen Transkriptase Aktivität. Das Polymeraseprotein setzt sich aus vier Domänen (Terminales Protein, Spacer, Reverse Transkriptase und RNaseH) zusammen, die in Abb. 5 und 6 schematisch wieder-

gegeben sind. Das „Terminale Protein“ ist essentiell für das „Priming“ der DNA-Synthese. Der Spacer-Region konnte bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Das Reverse Transkriptasegen kodiert für die HBV-RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität (RT-Aktivität). Der C-Terminus des HBV-Polymerasegens kodiert für die RNaseH-Aktivität. Die RT-Aktivität enthält das wichtige YMDD-Motiv, welches das katalytische Zentrum der RT-Aktivität bildet^{12, 13}. Innerhalb der RT-Aktivität werden 7 Domänen (A-G; Abb. 6) unterschieden¹⁴. Diese Domänen sind in Nukleotid- und pgRNA-(Template) Bindung involviert und katalysieren die Polymerasereaktion¹⁴.

Mutationen im HBV-Polymerasegen sind, bedingt durch die Überlappung mit dem preS/S Leserahmen, in der „Spacer“-Region zu finden, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Zum anderen finden sich entsprechende Aminosäureaustausche zum überlappenden Bereich der „a“-Determinante nahe der B-Domäne der viralen Polymerase (Abb. 5). Welchen Einfluss diese Mutationen auf die virale Polymeraseaktivität haben, ist bislang wenig untersucht.

Therapie und Selektion

Bis Ende der 90er Jahre war das Interferon-alpha (IFN) die einzige Therapieoption der chronischen HBV-Infektion¹⁵. Dabei gelingt bei etwa 40% der behandelten Patienten eine Serokonversion von positiven HBe-Antigen-Trägern zu anti-HBe, wobei die Langzeitprognose bei Patienten, die IFN sensitiv sind, deutlich besser ist. Diese Therapieform ist allerdings kostenintensiv und hat eine Reihe von Nebenwirkungen. Seit 1999 ist in Deutschland zudem das Nucleosidanaloga Lamivudin (Zeffix®), seit 2004 das Nucleotidanaloga Adefovir (Hepsera®) und seit 11/2006 Entecavir (Baraclud®) zugelassen¹⁶. Lamivudin hemmt die virale Polymeraseaktivität, insbesondere die des Humanen Immunodefizienz Virus (HIV) und die des HBV¹⁷. Nach Triphosphorylierung in der Zelle führt der Einbau des Nucleosids durch die Reverse Transkriptase zum Abbruch der DNA-Synthese und führt so zu einer Hemmung der viralen Replikation.

Zur Kontrolle der Virusreplikation ist eine Langzeittherapie mit Nucleosidanaloga

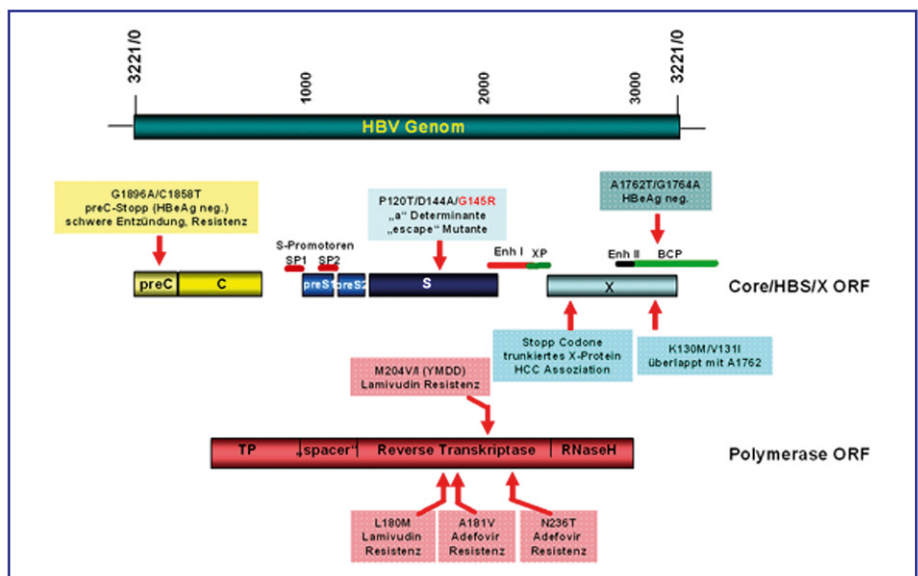


Abb. 4: Häufig selektionierte HBV-Mutationen. preC/C-Mutationen mit preC-Stopp-Mutation (gelb), HBsAg „a“-Determinante Mutation („Immunescape Mutante“; blau), Polymerase Mutationen (Resistenz Mutationen; rot), X-Protein Mutationen (grün).

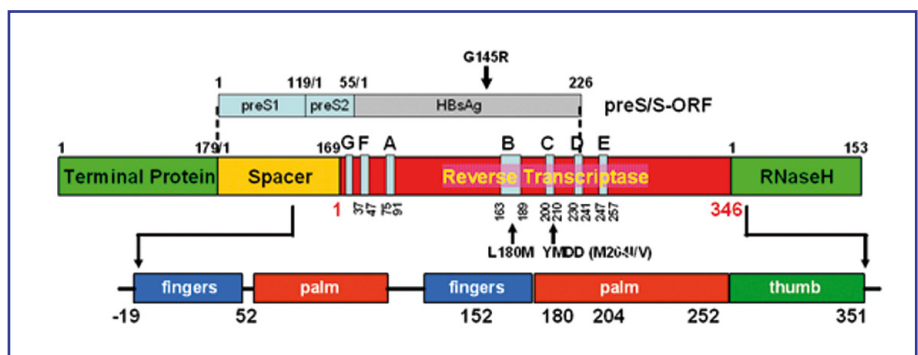


Abb. 5: Schematische Darstellung des HBV-Polymerase Leserahmens. Die wichtigsten Resistenzmutationen L180M, M204V/I sind eingezeichnet. Über dem Polymerasegen ist der überlappende HBV preS/S-Leserahmen eingezeichnet.

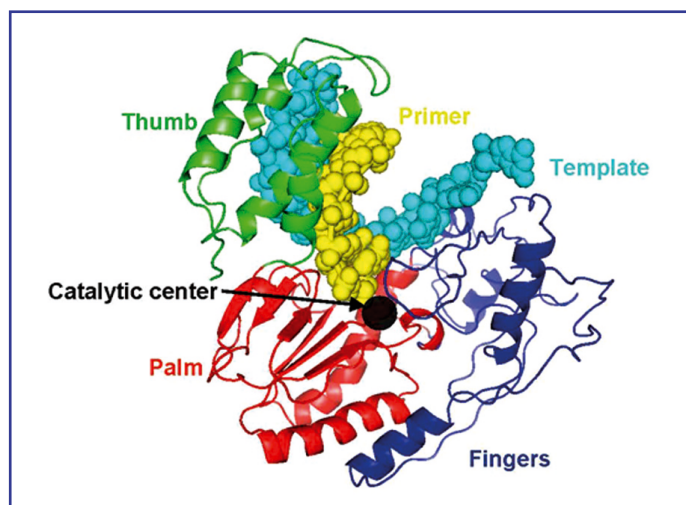


Abb. 6: 3D-Modell der HBV-Polymerase (Reverse Transkriptase (RT)). Einteilung in „fingers“, „palm“ und „thumb“ Domänen (Modifiziert nach Torresi 2006).

erforderlich, denn der für HBV typische Replikationsmechanismus ist mit einer sehr effizienten Virusproduktion und einer relativ langen Halbwertszeit der viralen cccDNA im Kern der infizierten

Zelle verbunden. Die Halbwertszeit der HBV-cccDNA liegt bei ca. 6-10 Tagen¹⁸, wobei sie durch den intrazellulären Infektionsweg permanent erneuert wird. Klinische Studien belegen, dass die >

Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des Hepatitis B Virus beginnt mit der Aufnahme des Virus in die Hepatozyten, wobei der oder die beteiligten zellulären Rezeptoren bislang unbekannt sind (Abb. 3a). Ebenfalls wenig bekannt ist, wie das virale Genom aus der Virushülle freigesetzt wird und in den Zellkern gelangt. Im Zellkern wird das partiell doppelsträngige virale Genom in einen vollständig geschlossenen zirkulären DNA-Strang („covalently closed circular“ DNA; cccDNA) vervollständigt (Abb. 3b;⁵). Die HBV-cccDNA wird dann mit Histon- und Nicht-Histonproteinen zum HBV-Minichromosom im Kern der infizierten Zelle verpackt⁶ und dient als Vorlage für die Transkription der prägenomischen RNA und HBV-mRNAs⁷.

Die weiteren Replikationsschritte des HBV erfolgen über einen durch die virale Reverse Transkriptase katalysierten Zwischenschritt. Dabei wird das HBV-RNA-Prägenom zusammen mit der viralen Polymerase in das HBV-Kapsid verpackt. Die Reifung des Virus erfolgt am Endoplasmatischen Retikulum (ER), in das die Oberflächenproteine eingelagert werden. Das infektiöse HBV-Virion wird dann über das ER, den Golgi-Apparat und über die Plasmamembran ausgeschleust⁸.

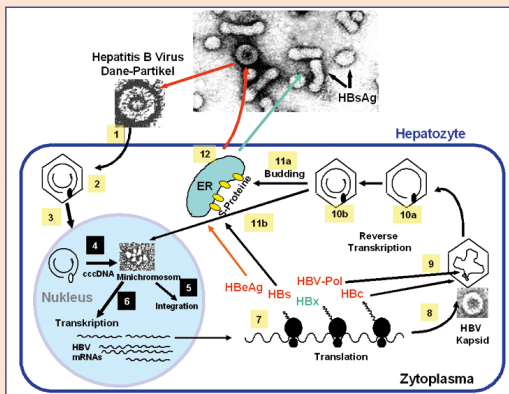


Abb. 3a: Schema des HBV-Replikationszyklus in der Hepatozyte. Beschreibung siehe Text. (EM Abbildungen, Bock & Zentgraf 1992; in Anlehnung an Nassal & Schaller⁸.)

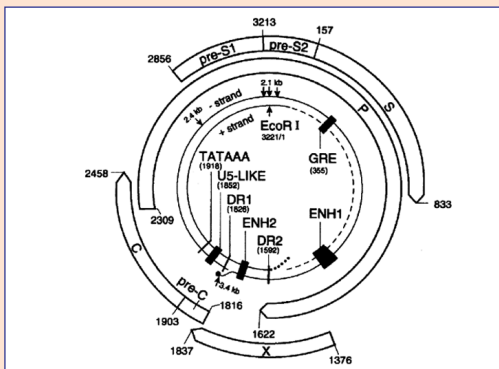


Abb. 3b: Schematische Darstellung des partiell doppelsträngigen, zirkulären HBV-Genoms. Die Leserahmen sind als Pfeile dargestellt. Referenzpunkt ist die EcoRI-Restriktionsschnittstelle (0/3221; in Anlehnung an Lee 1997)⁹.

Monotherapie mit Lamivudin zunächst mit einer signifikanten Reduktion der HBV-DNA, einer erhöhten Serokonversion von HBeAg und einer Inhibierung der Leberfibrose einhergeht. Allerdings werden innerhalb der ersten 12 Monate etwa 20% der behandelten Patienten resistent gegen Lamivudin. In jedem weiteren Jahr kommen statistisch etwa 15-20% Lamivudin-resistente Patienten hinzu, bis dies sich bei einer kumulativen Resistenzrate von ca. 70% stabilisiert^{19, 20}.

Lamivudin-Resistenz (kurze Systematik der Mutationen im YMDD-Motiv der viralen Polymerase)

Sequenzanalysen lokalisieren die primäre Lamivudin-Resistenzmutation im katalytischen Zentrum der HBV-Polymerase im YMDD-Motiv (C-Domäne; Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat; Abb. 5) mit einer YMDD- zu YVDD (Methionin nach Valin/M204V)- oder zu YIDD (Methionin nach Isoleucin/M204I)-Mutation. Das YMDD-Motiv ist der HBV-DNA Polymerase und der HIV-reversen Transkriptase gemeinsam. Eine weitere Mutation, die mit der Lamivudin-selektierten YMDD-Variante M204V assoziiert ist, findet sich in der B-Domäne der viralen Polymerase an Position L180M (Leuzin nach Methionin; Abb. 5).

Adefovir-Resistenz

Inzwischen hat sich auch bei Adefovir gezeigt, dass Resistenzmutationen an Position N236T (Asparagin nach Threonin) und A181V (Alanin nach Valin) der HBV-Polymerase selektiert werden können²¹. Erste Studien deuten darauf hin, dass nach etwa 5 Jahren Adefovir Resistenzmutationen bei 30% der Patienten zu erwarten sind^{21, 22}.

Prophylaxe nach Transplantation

Schwere klinische Verläufe nach Entwicklung einer Lamivudin-Resistenz mit Selektion einer YMDD-Mutation (M204I/V) wurden bisher vorwiegend bei Patienten mit chronischer Hepatitis B nach Lebertransplantation beschrieben²³. Da solche Patienten zur Prävention der HBV-Reinfektion mit einer Kombinationstherapie aus Lamivudin und einer passiven Immunprophylaxe mit

HB-Immunglobulin behandelt werden, lag der Verdacht nahe, dass Lamivudin Mutationen im YMDD-Motiv der HBV-Polymerase und das Immunglobulin Mutationen in der „a“-Determinante des HBV-S-Gens selektioniert. In Mutationsanalysen wurde neben den bekannten Lamivudin-YMDD-Mutationen M204V und L180M zusätzlich eine Mutation im Kodon T128N (Threonin nach Asparagin) des Polymerasegens entsprechend dem Kodon 120 des HBV-Oberflächenproteins (sP120T; Prolin nach Threonin) nachgewiesen. Klonierung der Mutation sP120T/rtL180M/rtM204V in ein replikationskompetentes HBV-Vektorsystem und anschließende funktionelle Analysen zeigten überraschenderweise eine erhöhte Replikationskompetenz der Resistenzvariante in Anwesenheit von Lamivudin (Abb. 7).

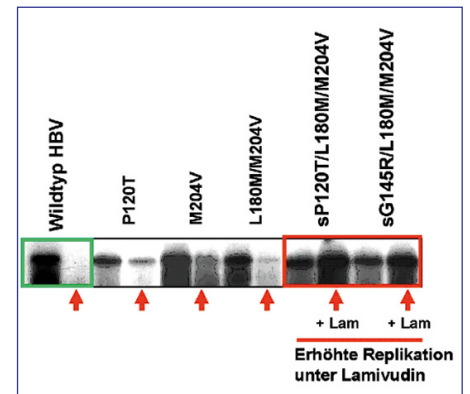


Abb. 7: Southern Blot Analyse der HBV-DNA zur Bestimmung der Replikationskompetenz von HBV-Wildtyp und HBV-Resistenzmutanten unter Lamivudin Behandlung. Links unbehandelt, rechts Lamivudin behandelte Probe (rote Pfeile). (Bock et al. 2002²⁴). Erklärung siehe Text.

Bessere virale Fitness

Dieses bis dahin nicht beschriebene Verhalten einer HBV-Resistenzmutation unter Therapie konnte anhand von molekularbiologischen Untersuchungen an HBV-Replikationsintermediaten nachgewiesen werden. Unter Zugabe von Lamivudin stieg völlig überraschend bei der Virusmutante die Replikation signifikant an. Zur Komplementierung dieser Befunde wurde eine analoge Erhöhung der extrazellulären, segregierten HBV-Mutante nachgewiesen. Vergleiche mit der Viruslast im Serum der Patienten bestätigten die in vitro-Daten und zeigten eine höhere Replikationskompetenz der HBV-Varianten unter Lamivudin²⁴.

Historischer Rückblick

Lange bevor das Hepatitis-Virus identifiziert werden konnte, wurde ein infektiöses Agens als Ursache der Hepatitis angenommen. 500 v.Ch. wurde im babylonischen Talmud der Begriff Gelbsucht erstmals erwähnt. 751 n.Ch. rät Papst Zacharias dem Erzbischof von Mainz, Patienten mit dem „infektiösen Typ“ von Gelbsucht zu isolieren. Fälle der so genannten „Serumhepatitis“ (heute als Hepatitis B Virus-Infektion bekannt) sind seit Mitte des 19. Jahrhunderts in den Krankenakten zu finden. 1855 wurde von Lurman zum ersten Mal wissenschaftlich das Auftreten von Infektionsfällen mit dem Bild einer koinzidalen Hepatitis nach einer Pockenschutzimpfung an einer Gruppe von Hamburger Werftarbeitern beschrieben¹. 1951 wurde von MacCallum der Begriff der Hepatitis B-Infektion eingeführt² und nach dem gesicherten Nachweis des Hepatitis B Virus von der World Health Organization (WHO) im Jahre 1973 übernommen. Vorangetrieben wurde der Erkenntnisgewinn über die virale Hepatitis B durch die Entdeckung des Oberflächenantigens des Virus durch Blumberg 1965³. Durch die Entdeckung des Hepatitis B Virus war es möglich geworden, viele der Posttransfusionshepatitiden zu vermeiden. Dennoch ist bis heute das Problem der HBV-Infektion nicht gelöst. Das Ziel aktueller intensiver Forschungen sind neben innovativen Diagnostik-Konzepten auch neue Strategien der antiviralen Therapie, um den klinischen Verlauf der bisher nicht heilbaren HBV-Infektion günstig zu beeinflussen.

Neue Substanzen

Das bereits in der Schweiz und den USA zugelassene Telbivudine (Tyzeka®) weist ein ähnliches Mutationsspektrum wie Lamivudin auf. Es selektioniert allerdings – soweit bisher bekannt – nur die YIDD (M204I)-Mutation. Dies ist relevant, da Entecavir bislang nur zu Resistenz-Mutationen führt, wenn bereits eine YVDD (M204V)-Mutation vorlag, nicht aber bei der YIDD (M204I)-Mutation. Bei einem geringen Prozentsatz der Patienten, die mit Lamivudin vorbehandelt waren, waren Aminosäure-Substitutionen der viralen Polymerase an Position T148, S202 und M250 zusätzlich zu der YVDD-Mutation vorzufinden oder entwickelten sich während der Entecavir Therapie innerhalb 96 Wochen. Die phänotypische und klinische Bedeutung dieser zusätzlichen Mutationen ist bislang nicht vollständig geklärt. Bei Nucleosid (Lamivudin)-naiven Patienten, die mehr als 48 Wochen behandelt wurden, konnten bislang keine spezifischen Aminosäure-Substitutionen in der HBV-Polymerasegenregion identifiziert werden, die mit einer phänotypischen Resistenz gegenüber Entecavir assoziiert waren.

Hinsichtlich der Resistenzentwicklung unter Tenofovir (Viread®) liegen derzeit nur wenige Informationen vor. Es wurde eine Mutation an Kodon 194 (A194T) beschrieben. Allerdings wird noch diskutiert, ob diese Mutation wirklich mit einer Resistenz assoziiert ist. Weitere

Nucleos(t)id-Analoga mit antiviraler Potenz gegen HIV und HBV befinden sich derzeit in der klinischen Erprobungsphase. Hierzu gehören z.B. Clevudine (L-FMAU) und Emtricitabine (Emtriva®).

Kombination verhindert Resistenz

Bei genauer Betrachtung der Resistenzentwicklung unter Nucleosid/Nucleotidanaloga Behandlung zeigt sich, dass eine Monotherapie mit einem Nucleosid/Nucleotidanaloga die Gefahr der Selektion spezifischer Resistenzmutationen begünstigt. Studien zu Kombinationstherapien mit Lamivudin und Adefovir haben gezeigt, dass zwar keine höhere Effektivität erreicht wird, langfristig gesehen das Risiko der Selektion von spezifischen Mutationen gehemmt werden kann. ■

Priv. Doz. Dr. rer. nat. C.-Thomas Bock
Universitätsklinikum Tübingen
Abteilung für Molekulare Pathologie, Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. R. Kandolf
Liebermeisterstr. 8 · 72076 Tübingen
E-mail: thomas.bock@med.uni-tuebingen.de

Literatur

- Lurman A. An icterus epidemic. *Berl Klin Wochenschr* 1855;22:20.
- MacCallum FO, McFarlan AM, Miles JA, Pollock MR, Wilson C. Infective hepatitis; studies in East Anglia during the period 1943-47. *Spec Rep Ser Med Res Counc (G B)* 1951;273:141-144.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541-546.

- Robert Koch Institut. *Virushepatitis B und C im Jahre 2003*. *Epid Bull* 2004;37:307-318.
- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989;9:322-327.
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol* 2001;307:183-196.
- Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol* 1986;58:17-25.
- Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat* 1996;3:217-226.
- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745.
- Girones R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 1989;170:595-597.
- Oldstone MB. Molecular anatomy of viral persistence. *J Virol* 1991;65:6381-6386.
- Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002;37:259-265.
- Zhou ZY, Sun J, Chen JJ, Hou JL, Luo KX. Detection of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2001;21:885-887.
- Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003;23:5-20.
- Guan R. Interferon monotherapy in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 (Suppl):34-40.
- Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 2000;118:83-103.
- Balzarini J, Wedgwood O, Kraining J, Pelemans H, Heijink R, De CE, et al. Anti-HIV and anti-HBV activity and resistance profile of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) and its arylphosphoramidate derivative CF 1109. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:363-369.
- Singh M, Dicaire A, Wakil AE, Luscombe C, Sacks SL. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods* 2004;118:159-167.
- Tillmann HL, Trautwein C, Bock CT, Glomb I, Kruger M, Boker KH, et al. Lamivudine transiently reduces viral load and improves liver function in liver transplant recipients with fibrosing cholestatic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:777-778.
- Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-117.
- Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003;125:292-297.
- Barcena MR, Cid GL, Lopez SP. Use of adefovir in the treatment of the chronic hepatitis B virus infection with resistance to lamivudine. *Transplant Proc* 2003;35:1841-1843.
- Tillmann HL, Trautwein C, Bock T, Boker KH, Jackel E, Glowienka M, et al. Mutational pattern of hepatitis B virus on sequential therapy with famciclovir and lamivudine in patients with hepatitis B virus reinfection occurring under HbLg immunoglobulin after liver transplantation. *Hepatology* 1999;30:244-256.
- Bock CT, Tillmann HL, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:264-273.