

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und  
Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Quantifizierung von polyadenylierter RNA des Hepatitis-B-Virus im  
Serum als prognostischer Marker für das Ansprechen auf eine  
Behandlung mit reversen Transkriptasehemmern**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Anne Bartens

aus Schönebeck / Elbe

Datum der Promotion: 11.12.2015

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Abstract</b>   | <b>11</b> |
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.1 Bedeutung der Hepatitis-B-Virusinfektion</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.2 Infektionsverlauf und Klinik der Hepatitis-B-Virusinfektion</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>1.3 Taxonomie und Morphologie des Hepatitis-B-Virus</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.4 Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus</b>  | <b>14</b> |
| <b>1.5 Replikation des Hepatitis-B-Virus</b>  | <b>16</b> |
| <b>1.6 Pathogenese der Hepatitis-B-Virusinfektion</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.7 Serummarker der Hepatitis-B-Virusinfektion</b>   | <b>18</b> |
| 1.7.1 HBV-DNA   | 18        |
| 1.7.2 Hepatitis-B-Surface-Antigen   | 19        |
| 1.7.3 Anti-HBs-Antikörper   | 19        |
| 1.7.4 Hepatitis-B-E-Antigen   | 19        |
| 1.7.5 Anti-HBe-Antikörper   | 19        |
| 1.7.6 Anti-HBc-Antikörper   | 19        |
| 1.7.7 HBV-RNA als neuer Serummarker   | 21        |
| <b>1.8 Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion</b>  | <b>21</b> |
| 1.8.1 Therapie der akuten HBV-Infektion   | 21        |
| 1.8.2 Therapie der chronischen HBV-Infektion  | 22        |
| 1.8.3 Gründe für das fehlende Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion              | 23        |
| 1.8.4 Offener medizinischer Bedarf in der Behandlung chronischer HBV-Infektionen mit Nukleos(t)id-Analoga | 24        |
| <b>2 Ziel der Arbeit</b>  | <b>25</b> |
| <b>3 Material und Methoden</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>   | <b>26</b> |
| <b>3.2 Reagenzien</b>   | <b>27</b> |
| 3.2.1 Allgemein verwendete Chemikalien  | 27        |
| 3.2.2 Reagenzien und Herstellung verwendeter Puffer und Nährmedien  | 27        |
| 3.2.3 Reagenzien für molekularbiologische Methoden  | 28        |
| <b>3.3 Primer und Sonden</b>  | <b>30</b> |

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.1 Primer  | 30        |
| 2.3.2 Hydrolysesonden   | 31        |
| <b>3.4 Plasmide</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.5 Molekularbiologische Methoden</b>                                | <b>32</b> |
| 3.5.1 Präparation der Nukleinsäuren aus Serum                           | 32        |
| 3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel                | 32        |
| 3.5.3 Herstellung DNA-freier RNA-Proben                                 | 32        |
| 3.5.4 Fällung der RNA   | 32        |
| 3.5.5 Reverse Transkription   | 33        |
| 3.5.6 Polymerase Kettenreaktion   | 34        |
| 3.5.7 Agarosegel-Elektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte           | 35        |
| 3.5.8 Klonierung von PCR-Produkten                                      | 36        |
| 3.5.9 Präparation von Plasmiden   | 36        |
| 3.5.10 <i>EcoRI</i> -Verdau von Plasmid-DNA                             | 36        |
| 3.5.11 Sequenzierung  | 37        |
| 3.5.12 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts einer Lösung                  | 38        |
| <b>3.6 Bestimmung weiterer Serummarker der HBV-Infektion</b>            | <b>39</b> |
| 3.6.1 HBV-DNA   | 39        |
| 3.6.2 Hepatitis-B-Surface-Antigen                                       | 39        |
| 3.6.3 Hepatitis-B-E-Antigen   | 39        |
| 3.6.4 Anti-HBs-Antikörper   | 39        |
| 3.6.5 Anti-HBe-Antikörper   | 39        |
| 3.6.6 Genotypisierung   | 40        |
| 3.6.7 Alanin-Aminotransferase   | 40        |
| <b>3.7 Statistische Auswertung</b>                                      | <b>40</b> |
| <b>4 Ergebnisse</b>   | <b>41</b> |
| <b>4.1 Qualitativer Nachweis von HBV-RNA im Serum</b>                   | <b>41</b> |
| 4.1.1 Nachweis von S-Gen-spezifischer RNA                               | 41        |
| 4.1.2 Optimierung der RNA-Isolierung                                    | 41        |
| <b>4.2 Quantitativer Nachweis von polyadenylierter HBV-RNA im Serum</b> | <b>43</b> |
| 4.2.1 Design von Primern und Sonden                                     | 43        |
| 4.2.2 Testung der RT-qPCR   | 45        |
| 4.2.3 Spezifität der RT-qPCR  | 47        |
| 4.2.4 Plasmid-basierte Positivkontrollen und Standards                  | 49        |
| 4.2.5 Plasmid-basierte interne Kontrollen                               | 51        |
| 4.2.6 Optimierung der PCR-Ansätze und -Bedingungen                      | 56        |

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.7 Etabliertes Standardprotokoll zur Amplifikation von polyadenylierter HBV-RNA im Serum                              | 59        |
| 4.2.8 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenzen) der RT-qPCR   | 59        |
| 4.2.9 Bestimmung des linearen Messbereichs   | 62        |
| <b>4.3 Charakterisierung des Patientenkollektivs</b>   | <b>64</b> |
| 4.3.1 Auswahl der Patienten und Herkunft der Seren   | 64        |
| 4.3.2 Weitere Charakteristika der Patienten  | 65        |
| 4.3.3 Patientenkollektiv für die Berechnungen der Kinetik der Parameter unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga          | 65        |
| <b>4.4 Polyadenylierte HBV-RNA im Serum vor Therapiebeginn</b>   | <b>66</b> |
| 4.4.1 Serumkonzentrationen der HBV-trRNA und -flRNA im Vergleich   | 67        |
| 4.4.2 HBV-RNA im Vergleich zu anderen Parametern   | 68        |
| 4.4.3 Vergleich HBeAg-positiver und HBeAg-negativer Patienten  | 71        |
| <b>4.5 Kinetik polyadenylierter HBV-RNA im Serum unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga</b>                             | <b>72</b> |
| 4.5.1 HBV-trRNA und HBV-flRNA im Vergleich   | 73        |
| 4.5.2 Assoziation von HBV-DNA-Konzentrationen mit HBeAg-Serokonversion   | 76        |
| 4.5.3 Assoziation von HBsAg-Konzentrationen mit HBeAg-Serokonversion   | 76        |
| 4.5.4 Assoziation von HBV-RNA-Konzentrationen vor und während antiviraler Therapie mit HBeAg-Serokonversion              | 77        |
| 4.5.5 Multivariate Analyse der Assoziation verschiedener Parameter mit der HBeAg-Serokonversion                          | 80        |
| 4.5.6 Vorhersagekraft des Abfalls polyadenylierter HBV-RNA im Serum hinsichtlich einer konsekutiven HBeAg-Serokonversion | 82        |
| 4.5.7 Vergleich der Kinetik der HBV-RNA unter der Therapie mit unterschiedlichen Nukleos(t)id-Analoga (TDF versus LAM)   | 86        |
| <b>5 Diskussion</b>  | <b>88</b> |
| <b>5.1 Spezifischer Nachweis von polyadenylierter HBV-RNA im Serum</b>   | <b>88</b> |
| 5.1.1 Annahmen zur Herkunft der HBV-trRNA  | 90        |
| 5.1.2 Annahmen zur Konformation der polyadenylierten HBV-RNA im Serum  | 90        |
| <b>5.2 Prädiktion von serologischer Response anhand von polyadenylierter HBV-RNA im Serum</b>                            | <b>92</b> |
| 5.2.1 Eigenschaften unseres Patientenkollektivs  | 92        |
| 5.2.2 Polyadenylierte HBV-RNA im Serum vor Therapiebeginn  | 92        |
| 5.2.3 HBV-RNA im Serum bei HBeAg-negativen Patienten vor Therapie  | 94        |
| 5.2.4 HBV-RNA im Serum unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga   | 94        |
| <b>5.3 Ausblick: Weitere Responsemarker der HBV-Behandlung und weitere Studien zur HBV-RNA im Serum</b>                  | <b>96</b> |



## Inhaltsverzeichnis

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| <b>6 Literaturverzeichnis</b>       | <b>97</b>  |
| <b>Eidesstattliche Versicherung</b> | <b>104</b> |
| <b>Lebenslauf</b>                   | <b>106</b> |
| <b>Danksagung</b>                   | <b>107</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|          |  |
|----------|--|
| Abb.     | Abbildung  |
| ALT      | Alanin-Aminotransferase  |
| Anti-HBc | Antikörper gegen HBcAg   |
| Anti-HBe | Antikörper gegen HBeAg   |
| Anti-HBs | Antikörper gegen HBsAg   |
| Anti-HD  | Antikörper gegen Hepatitis-Delta-Antigen                             |
| AST      | Aspartat-Aminotransferase  |
| AUC      | Area under the curve   |
| bp, kbp  | Basenpaare (Kilobasen = 1000 Basenpaare)                             |
| BHQ      | BlackHole™ Dark Quencher   |
| BLAST    | Basic Local Alignment Search Tool                                    |
| bzw.     | beziehungsweise  |
| cccDNA   | covalently closed circular DNA                                       |
| CD       | Cluster of differentiation   |
| cDNA     | complementary DNA  |
| Cp       | Crossing Point   |
| DGVS     | Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und<br>Stoffwechselkrankheiten |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.: deoxyribonucleic acid</i> )       |
| dNTP     | Desoxy-Nukleosidtriphosphat  |
| dUTP     | Desoxy-Uridin-Triphosphat  |
| DTT      | Dithiotreithiol  |
| EDTA     | Ethylendiamintetraacetat   |
| ELISA    | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                                    |
| engl.    | englisch   |
| flRNA    | Gesamtlängen-HBV-RNA ( <i>engl. full length</i> )                    |
| flcDNA   | Gesamtlängen-HBV-cDNA ( <i>engl. full length</i> )                   |
| flPK     | Positivkontrolle für Ansätze der HBV-flRNA                           |
| flIC     | Interne Kontrolle für Ansätze der HBV-flRNA                          |
| FRET     | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers                               |
| g        | Gramm  |
| GOT      | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase                                     |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| GPT               | Glutamat-Pyruvat-Transaminase   |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser  |
| HBV               | Hepatitis-B-Virus   |
| HBcAg             | Hepatitis-B-Core-Protein = HBc-Antigen                                    |
| HBeAg             | HBe-Antigen   |
| HBsAg             | Hepatitis-B-Surface-Antigen   |
| HCC               | Hepatozelluläres Karzinom   |
| HIV               | Humanes Immundefizienz-Virus  |
| HPLC              | high performance liquid chromatography                                    |
| IC                | Interne Kontrolle ( <i>engl. internal control</i> )                       |
| IFCC              | International Federation of Clinical Chemistry and<br>Laboratory Medicine |
| IFN               | Interferon  |
| IgG               | Immunglobulin der Klasse G  |
| IgM               | Immunglobulin der Klasse M  |
| i.v.              | intravenös  |
| KCL               | Kaliumchlorid   |
| l                 | Liter   |
| LAM               | Lamivudin   |
| LB                | <i>Luria bertani (engl. lysogeny broth)</i>                               |
| M                 | Molar   |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid  |
| min               | Minute  |
| MHC               | major histocompatibility complex  |
| mol               | Mol   |
| mRNA              | messenger RNA   |
| NaCl              | Natriumchlorid  |
| NaOH              | Natriumhydroxid   |
| NK                | Negativkontrolle  |
| NK-Zellen         | Natürliche Killerzellen   |
| NPV               | Negativer Vorhersagewert ( <i>engl. negative predictive value</i> )       |
| NWG               | Nachweisgrenze  |
| ORF               | Offener Leserahmen ( <i>engl. open reading frame</i> )                    |
| PCR               | Polymerasekettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )       |

## Abkürzungsverzeichnis

|         |   |
|---------|---|
| pgRNA   | prägenomische RNA   |
| PK      | Positivkontrolle  |
| PolyA   | Polyadenosintriphosphat   |
| PPV     | Positiver Vorhersagewert ( <i>engl. positive predictive value</i> )                           |
| qPCR    | quantitative Polymerasekettenreaktion ( <i>engl. quantitative polymerase chain reaction</i> ) |
| rER     | raues endoplasmatisches Retikulum   |
| RKI     | Robert-Koch-Institut  |
| RNA     | Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )  |
| ROC     | Receiver Operating Characteristic   |
| RT      | Reverse Transkription   |
| RT-qPCR | Real-Time-quantitative-PCR  |
| sec     | Sekunde   |
| SOB     | Super Optimal Broth   |
| SOC     | SOB plus Glukose  |
| SPSS    | Statistical Package for the Social Sciences / Superior Performing Software System             |
| STIKO   | Ständige Impfkommission   |
| Tab.    | Tabelle   |
| TDF     | Tenofovir Disoproxil Fumarat  |
| TH      | T-Helfer  |
| trRNA   | trunkierte HBV-RNA( <i>engl. truncated</i> )  |
| trcDNA  | trunkierte HBV-cDNA ( <i>engl. full length</i> )  |
| trPK    | Positivkontrolle für Ansätze der HBV-trRNA  |
| trIC    | Interne Kontrolle für Ansätze der HBV-trRNA   |
| U       | Enzymeinheit ( <i>engl. unit</i> )  |
| u.a.    | unter anderem   |
| U / min | Umdrehungen pro Minute  |
| ULN     | Oberer Grenzwert ( <i>engl. upper limits of normal</i> )                                      |
| WHO     | World Health Organization   |
| μ       | mikro   |
| Z.n.    | Zustand nach  |

## Zusammenfassung

Während der Behandlung der chronischen Hepatitis-B-Virus(HBV)-Infektion mit Nukleos(t)id-Analoga, welche durch Hemmung der reversen Transkription die HBV-Replikation inhibieren, kann bei den meisten Patienten eine Suppression der HBV-DNA im Serum unter die Nachweisgrenze und damit eine Verringerung der Folgeschäden der HBV-Infektion erreicht werden. Nach Beendigung der Behandlung kommt es jedoch meist zu einem Wiederanstieg der HBV-Replikation, weshalb die Dauer der Behandlung undefiniert und für die meisten Patienten wahrscheinlich lebenslang ist.

Bei einigen Patienten stellt sich allerdings während der Langzeitbehandlung mit Nukleos(t)id-Analoga eine immunologische Kontrolle ein, die eine Beendigung der Behandlung erlaubt. So tritt bei etwa 50% der HBeAg-positiven Patienten unter Langzeittherapie mit Nukleos(t)id-Analoga eine HBeAg-Serokonversion auf. Bei etwa 11% der HBeAg-positiven und bei sehr wenigen HBeAg-negativen Patienten kommt es zum Verlust der Nachweisbarkeit des HBsAg. Eine Vorhersage des HBsAg-Verlusts kann anhand der Kinetik des HBsAg unter Therapie getroffen werden. Die Vorhersage der HBeAg-Serokonversionen wurde bislang anhand der Serummarker HBV-DNA und HBsAg untersucht, ist bislang allerdings nicht zuverlässig möglich. Die Vorhersage einer HBeAg-Serokonversion würde aber eine individuelle Planung der Behandlung ermöglichen und wäre auch für zukünftige Therapieformen wichtig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen HBV-RNA im Serum mit HBeAg-Serokonversion während einer Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga zu untersuchen.

Dazu wurde eine RACE-basierte quantitative Real-Time-PCR zur Quantifizierung polyadenylierter HBV-RNA (trunkierte, trRNA und Gesamtlängen-HBV-RNA, flRNA) mit hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit etabliert. Anschließend wurden die Konzentrationen der HBV-RNA im Serum von 79 Patienten mit chronischer HBV-Infektion vor sowie während der antiviralen Behandlung mit Tenofovir (245 mg / Tag) oder Lamivudin (100 mg / Tag) bezüglich ihrer Assoziation mit HBeAg-Serokonversion untersucht. Die Kinetiken von HBV-RNA, HBV-DNA und HBsAg unter Therapie sowie der Einfluss weiterer Marker wurden in einem multivariaten Modell bezüglich ihrer Assoziation mit einer HBeAg-Serokonversion verglichen.

Vor Therapiebeginn lagen die mittleren Serumkonzentrationen der HBV-trRNA: bzw.-flRNA bei  $5,31 \pm 2,18$  [0 – 8,48] bzw.  $4,80 \pm 2,18$  [0 – 8,01]  $\log_{10}$  Kopien / ml. Bereits nach 3-monatiger Therapie zeigte sich eine starke Assoziation der Suppression der HBV-RNA und anschließender serologischer Response ( $p < 0,001$ ). In der multivariaten Analyse war die

## Zusammenfassung

Prädiktion der serologischen Response durch die Kinetik der HBV-RNA stärker als durch die Kinetik der übrigen Parameter. Die Receiver Operating Characteristic (ROC) – Kurve zeigte für den Abfall der HBV-RNA von  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml nach 3-monatiger Therapie eine hohe Trennschärfe (trRNA AUC = 0,85 und flRNA: AUC = 0,73).

Die vorliegende Arbeit belegt somit als erste Studie den Wert der HBV-RNA im Serum für die Vorhersage der HBeAg-Serokonversion unter Therapie mit Nukleo(s)tid-Analoga.

## Abstract

During antiviral treatment of chronic hepatitis B virus (HBV) infections with nucleo(s)tide analogues, which inhibit the reverse transcription of HBV RNA, suppression of HBV DNA in serum and a decrease of late sequel of the HBV infection can be achieved in the majority of patients. After cessation of treatment most patients suffer a relapse in viral replication. Therefore, the optimal treatment duration is undefined and will be lifelong for most patients.

However, some patients can achieve immunologic control over the HBV infection during long-term treatment with nucleos(t)ide analogues, allowing a termination of treatment. Thus, 50% of patients were described to achieve HBeAg seroconversion. HBsAg loss was observed in 11% of HBeAg positive and in very few HBeAg negative patients. HBsAg loss can be predicted by kinetics of HBsAg during treatment. Prediction of HBeAg seroconversion has been assessed using the markers HBV DNA and HBsAg, however to date a reliable prediction is not available. However, prediction of HBeAg seroconversion would be desirable for individualization of antiviral treatment and also for the monitoring of future treatment approaches. Aim of this study was to examine the association between serum levels of HBV RNA and the appearance of HBeAg seroconversion during antiviral treatment with nucleos(t)ide analogues. For this, we established a new RACE-based real-time PCR for the quantitative analysis of polyadenylated HBV-RNA, truncated (trRNA) and full length (flRNA) RNA with a high sensitivity, specificity and reproducibility. Then, levels of circulating HBV-RNA (trRNA and flRNA) in serial serum samples from patients ( $n = 79$ ) with chronic HBV infection who received antiviral treatment with tenofovir (245mg/day) or lamivudine (100mg/day) were assessed for their association with HBeAg seroconversion. Multivariate analyses of factors associated with HBeAg seroconversion were carried out examining the kinetics of HBV RNA, HBV DNA and HBsAg as well as other parameters. At baseline, high concentrations of HBV trRNA and flRNA were measured ( $5,31 \pm 2,18 [0 - 8,48] \log_{10}$  copies / ml and  $4,80 \pm 2,18 [0 - 8,01] \log_{10}$  copies / ml). A significant decline in mean HBV-RNA levels after 3 months of treatment was demonstrated among patients who achieved HBeAg seroconversion ( $p < 0.001$ ). In the multivariate analysis, the highest association with HBeAg seroconversion was shown for the kinetics of HBV trRNA and HBV flRNA levels during treatment. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves indicated a strong prediction of HBeAg seroconversion for suppression of HBV RNA of  $1,0 \log_{10}$  copies/ml during antiviral treatment (trRNA: AUC = 0,85; flRNA: AUC = 0,73).

As a result, our study is the first to show the value of serum HBV RNA for the prediction of HBeAg seroconversion during antiviral treatment with nucleo(s)tide analogues.

# 1 Einleitung

## *1.1 Bedeutung der Hepatitis-B-Virusinfektion*

Die Hepatitis-B-Infektion (HBV) ist eine der Viruserkrankungen mit der größten globalen Verbreitung. Jährlich sterben weltweit etwa 600000 Menschen an den Spätfolgen einer HBV-Infektion wie Leberzirrhose oder hepatozellulärem Karzinom<sup>1</sup>. Die Prävalenz der HBV-Infektion ist in den verschiedenen Ländern sehr unterschiedlich. Seit 1995 gibt die STIKO neben der Empfehlung zur aktiven Immunisierung bestimmter Gruppen mit erhöhtem Infektionsrisiko (z.B. medizinisches Personal) auch die Empfehlung zur Impfung aller Kinder im Säuglings- und Kindesalter heraus<sup>2</sup>. Aus diesem Grund ist in Deutschland und in anderen Ländern mit Impfprogrammen gegen HBV die Rate der HBV-Neuinfektionen stark rückläufig.

## *1.2 Infektionsverlauf und Klinik der Hepatitis-B-Virusinfektion*

Die Inkubationszeit einer HBV-Infektion beträgt 30 bis 180 Tage<sup>3</sup>.

Es werden verschiedene Verlaufsformen der HBV-Infektion unterschieden:

Die akute HBV-Infektion heilt bei 80-90% der im Erwachsenenalter Infizierten innerhalb von 6 Monaten aus. Als Ausheilung bezeichnet man den Verlust der Nachweisbarkeit von HBsAg im Serum. Bei Infektionen im Kindesalter bzw. bei Mutter-Kind-Infektionen ist die Ausheilungsrate niedriger<sup>4</sup>.

Ist das Virus länger als 6 Monate nachweisbar, liegt eine chronische HBV-Infektion<sup>4</sup>.

Die chronische HBV-Infektion durchläuft in der Regel zunächst ein hoch-replikatives Stadium mit nachweisbarem HBeAg. Im späteren Verlauf kommt es bei vielen Patienten zur HBeAg-Serokonversion. Anschließend sind statt HBeAg anti-HBe-Antikörper nachweisbar, die Krankheit verläuft häufig asymptomatisch und Komplikationen werden seltener. Jahre bis Jahrzehnte nach HBeAg-Serokonversion kann ein Verlust des HBsAg eintreten, eventuell mit Nachweis von anti-HBs (HBsAg-Serokonversion). Man spricht (wie nach der akuten HBV-Infektion) dann von einer klinischen Ausheilung. Hiervon zu unterscheiden ist die HBeAg-negative HBV-Infektion, welche durch fehlende Nachweisbarkeit von HBeAg aufgrund von Virusmutationen und ebenfalls fehlende Nachweisbarkeit von anti-HBe gekennzeichnet ist. Ein HBsAg-Verlust tritt bei dieser Erkrankungsform sehr selten auf.

Auch nach HBsAg-Verlust/-Serokonversion verbleibt im Zellkern der Hepatozyten die Matrize der HBV-Replikation, die HBV-cccDNA. Eine Reaktivierung (z.B. unter Immunsuppression) ist auch nach vielen Jahrzehnten noch möglich<sup>4</sup>.



## Einleitung

Symptome im Stadium der Hepatitis sind als Zeichen der Leberzellzerstörung u.a. Ikterus, Dunkelfärbung des Urins, Entfärbung des Stuhls, Juckreiz und zudem eine palpable Lebervergrößerung<sup>3</sup>. Patienten mit chronischer Hepatitis B haben ferner ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leberzirrhose (20% der Patienten in 10 Jahren) und ein 100-fach höheres Risiko zur Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms (15% der Zirrhosepatienten in 5 Jahren), außerdem zur Entwicklung einer Panarteriitis nodosa oder membranoproliferative Glomerulonephritis<sup>5-7</sup>. Ein entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose ist die Viruslast (HBV-DNA)<sup>5</sup>.

Der niedrig virämische, inaktive HBsAg-Trägerstatus ist gekennzeichnet durch einen langfristigen chronischen Verlauf der HBV-Infektion mit niedriger HBV-DNA im Serum sowie HBeAg-negativen Status. Die Entwicklung einer Hepatitis B ist ebenfalls möglich. Die Entwicklung wird bei HBV-infizierten auch ohne das Vorliegen einer Zirrhose beobachtet, was auf eine kanzerogene Wirkung der HBV-Infektion schließen lässt.

### ***1.3 Taxonomie und Morphologie des Hepatitis-B-Virus***

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu der Familie der Hepadnaviridae. Der Name leitet sich vom griechischen Wort „hepar“ für Leber und dem DNA-Genom des Virus ab. Die verschiedenen Viren lassen sich zwei Genera zuordnen: Avihepadnaviren und Orthohepadnaviren, zu welchen auch das humanpathogene HBV gehört. Aus der phylogenetischen Stammbaumanalyse resultieren acht humanpathogene Genotypen, A bis H, die aufgrund von Abweichungen von mehr als 8% des Gesamtgenoms definiert werden und die sich hinsichtlich des klinischen Infektionsverlaufes und der geografischen Verbreitung unterscheiden<sup>8,9</sup>.

Das HBV ist ein behülltes, relativ großes Virus von etwa 42 nm Durchmesser mit einem etwa 28 nm großem Nukleokapsid (Abbildung 1). Das intakte Virion zeigt im elektronenmikroskopischen Bild eine sphärische Form. Es wurde erstmals 1970 von Dane abgebildet und wird daher auch als Dane-Partikel bezeichnet<sup>10</sup>. Das Nukleokapsid besteht aus dem Core-Protein (HBcAg) und beinhaltet die zirkuläre, teilweise doppelsträngige DNA mit einer Genomlänge von etwa 3200 bp. Umhüllt ist das Virus von einer Membran, die aus Membranbestandteilen der Wirtszelle und Oberflächenproteinen, HBs-Antigenen in den drei Größen L (large), M (middle) und S (small), besteht.

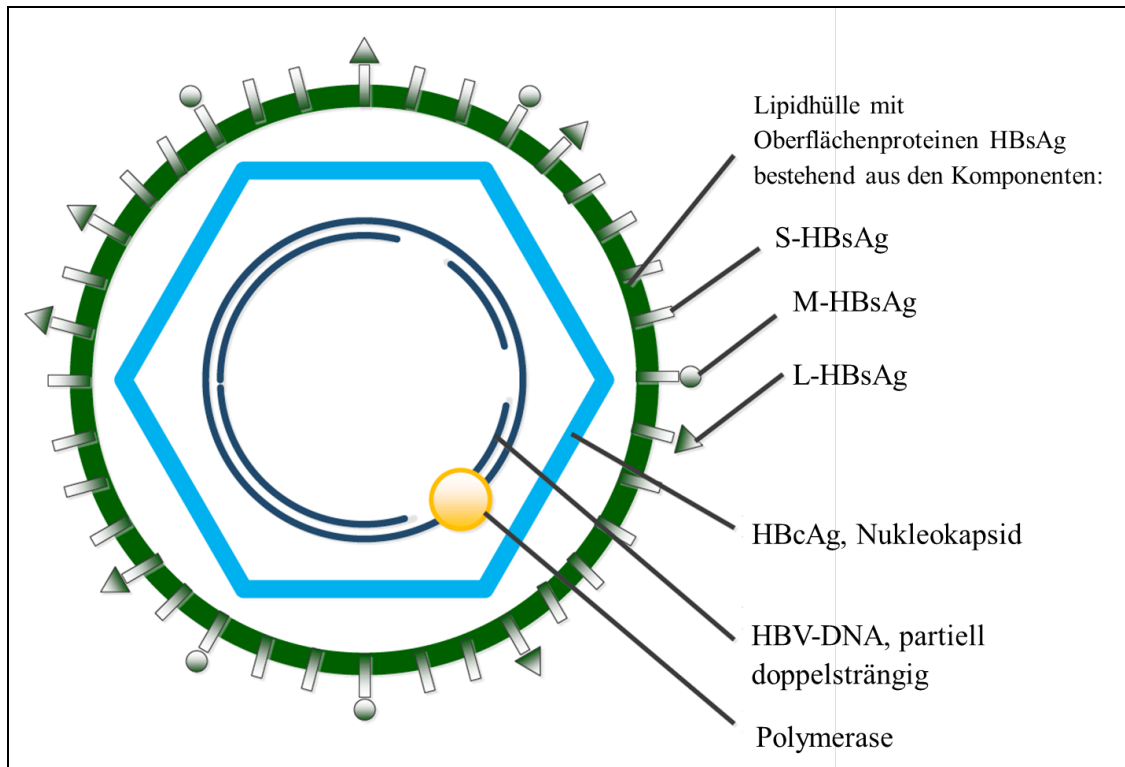


Abb. 1 Struktur des Hepatitis-B-Virions. Schematische Darstellung.

#### ***1.4 Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus***

Die Organisation des HBV-Genoms und die resultierenden Genprodukte sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die DNA des Hepatitis-B-Virus liegt zirkulär und partiell doppelsträngig vor. Der Minusstrang hat eine Länge von etwa 3200 bp<sup>6</sup>. An seinem 5'-Ende ist er über eine Phosphotyrosin-Brücke mit der DNA-Polymerase verbunden. Die HBV-Polymerase ist ein multifunktionelles Enzym mit vier Enzymaktivitäten: DNA- und RNA-abhängige DNA-Polymerase, reverse Transkriptase und RNase H-Aktivität<sup>11</sup>. Der gegenläufige Plusstrang ist unvollständig und misst 40 – 85% der Gesamtlänge des Genoms. An diesen 3'-Enden sind kurze RNA-Sequenzen als Primer kovalent gebunden<sup>12</sup>.

## Einleitung

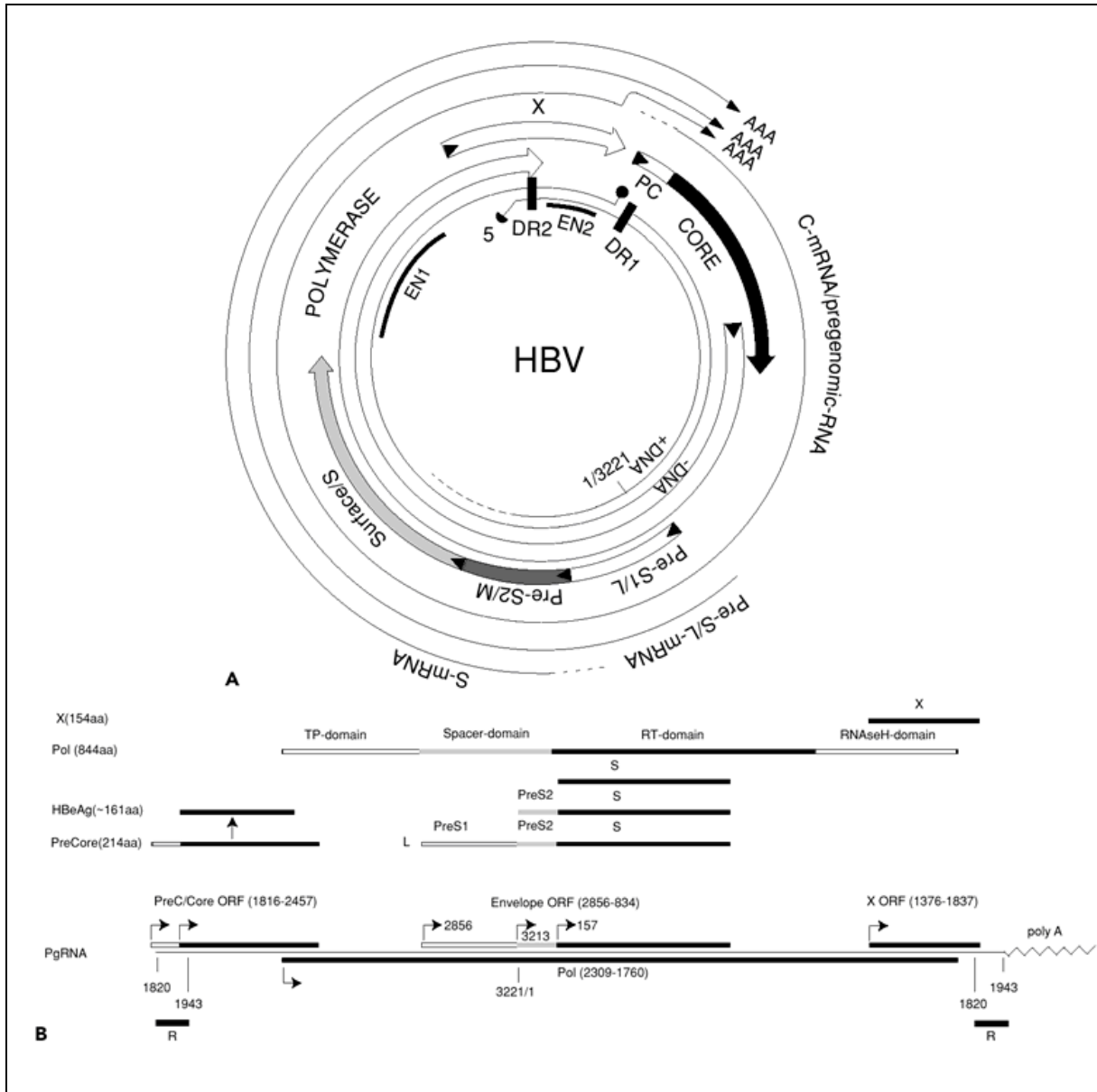


Abb. 2 Die Genomorganisation des HBV (A) und die resultierenden Genprodukte (B), modifiziert nach Seeger et al.<sup>13</sup>

**A** Die beiden inneren Ringe kennzeichnen die DNA-Plus- und Minusstränge (+DNA, -DNA) und die Blockfeile symbolisieren die vier offenen Leseraster: Polymerase (Pol), X-Proteine, S-Proteine, PC/Core-Protein. Die äußeren Ringe stehen für die viralen Transkripte.

**B** Die prägenomische RNA (pgRNA) ist unten dargestellt mit der Lage der vier ORFs. Die Balken symbolisieren die translatierten und modifizierten Proteine. Enhancer (EN), Posttranskriptional regulatorisches Element (PRE), Direct Repeat (DR).

Die Genomorganisation ist aufgrund der kurzen Genomlänge relativ kompakt.

## Einleitung

So besitzt das HBV vier überlappende offene Leserahmen (ORF) mit je einem Promotor, zwei Enhancerelementen zur Regulation der Transkription, ein Polyadenylierungssignal, ein funktionelles Polyadenylierungssignal und weitere Signale zur Regulation der Replikation<sup>14</sup>.

Es existieren demnach vier bekannte Gene, deren DNA-Sequenzen sich teilweise überlappen (Tabelle 1):

Tab. 1 Gene und Proteine des Hepatitis-B-Virus

| Gen        | Protein / Funktion  |
|------------|---|
| S-Gen      | Oberflächenproteine L, M und S  |
| PräC/C-Gen | Nukleokapsidprotein (HBcAg)<br>Präcoreprotein (sezerniertes HBeAg)                    |
| P-Gen      | P-Protein (DNA- bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerase,<br>reverse Transkriptase, RNase H) |
| X-Gen      | X-Protein (HBxAg)   |

Das X-Protein ist wahrscheinlich ein multifunktionales Protein, das an der Regulation zellulärer Signaltransduktionswege, Zellzyklusprozesse, DNA-Reparaturmechanismen, Apoptose und Genstabilisierung eine wichtige Rolle spielt<sup>15,16</sup>.

### ***1.5 Replikation des Hepatitis-B-Virus***

Der Lebenszyklus des HBV ist in Abbildung 3 dargestellt. Zur Sicherung der Erbinformation des HBV wird der Plusstrang der partiell doppelsträngigen DNA mit Hilfe der viralen Polymerase komplettiert und der DNA-Ring unter Bildung der cccDNA kovalent geschlossen<sup>17</sup>. Die cccDNA liegt als Minichromosom frei im Nukleoplasma vor. Nur selten wird ein Teil der HBV-DNA im Zellkern der Wirtszelle, des Hepatozyten, ins Wirtsgenom integriert<sup>18</sup>.

Die zelluläre RNA-Polymerase II katalysiert die virale Transkription, wobei vier Haupttranskripte entstehen. Nach Aktivierung des gemeinsamen Polyadenylierungssignals TATAAA an Position 1916-1921 nt enden alle viralen RNAs an gleicher Stelle<sup>19,20</sup>. Zu den resultierenden RNAs zählt die etwa 3,5 kb lange prägenomische RNA (pgRNA), welche einerseits als Matrize für die Synthese des HBcAg und der viralen Polymerase und andererseits als Matrize zur Replikation des HBV-Genoms dient<sup>21,22</sup>. Die messenger RNAs (mRNAs) von 2,1 - 2,4 kb Länge entstehen durch Transkription des S-Gens und dienen der Synthese der großen, mittleren und kleinen Oberflächenproteine (HBsAg). Das kleinste Transkript von 0,7 kb dient

## Einleitung

der Synthese des X-Proteins<sup>13</sup>. Unter bis heute noch nicht geklärten Bedingungen wird ein funktionelles Polyadenylierungssignal der Sequenz CATAAA an Position 1788-1793 nt aktiv, sodass verkürzte Transkripte entstehen<sup>14</sup>. Die Synthese der Proteine findet dann im Zytoplasma statt. Die Oberflächenproteine werden in das raue endoplasmatische Retikulum (rER) inseriert und können auch autonom subvirale Partikel bilden. Im Zytoplasma lagern sich das Coreprotein, der virale Promoter und die pgRNA durch „self-assembly“ zu einem Nukleokapsid zusammen. Kurz vor und nach der Zusammenlagerung wird pgRNA in cDNA umgeschrieben und es findet die DNA-Plusstrang-Synthese statt<sup>23</sup>. Ein Teil der reifen Kapside verschmilzt mit den Hüllproteinen am rER, sodass Virionen entstehen, welche an die Zelloberfläche transportiert und sezerniert werden. Der andere Teil der Kapside wird für die Synthese zusätzlicher cccDNA in den Zellkern reimportiert.

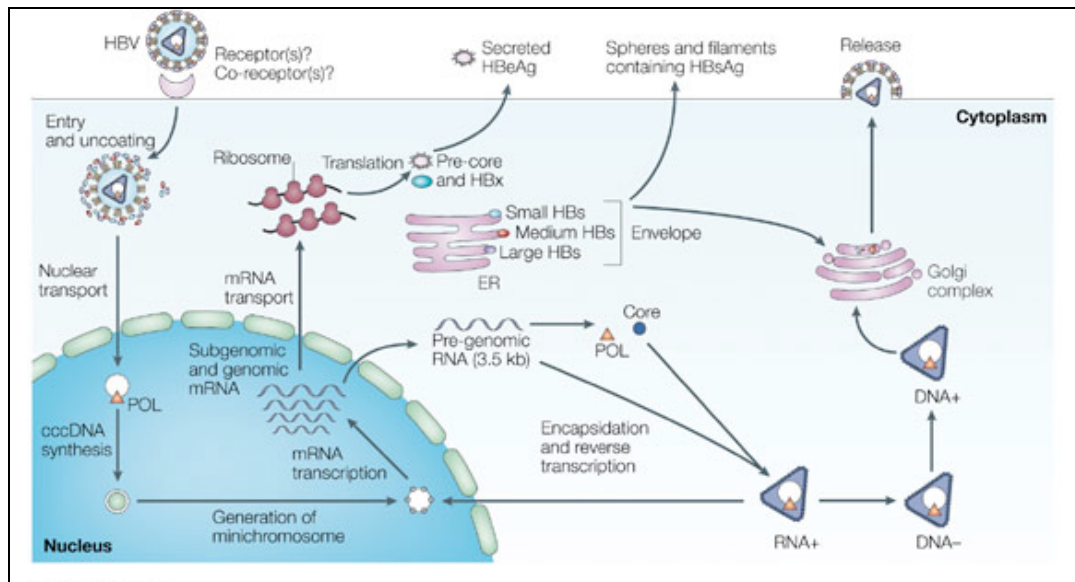


Abb. 3 Der Lebenszyklus des HBV aus Rehmann et al.<sup>24</sup>

### 1.6 Pathogenese der Hepatitis-B-Virusinfektion

Das Hepatitis-B-Virus ist nicht zytotoxisch, sondern die Immunantwort des Infizierten führt zur Erkrankung<sup>25</sup>. Die infizierte Zelle präsentiert an ihrer Zelloberfläche Virus-Proteine, woraufhin vorwiegend zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten daraufhin Zytokin-vermittelte Immunreaktionen und die Zytolyse dieser Zelle induzieren<sup>25</sup>.

Der Verlauf der HBV-Infektion, Persistenz oder Ausheilung, wird durch die Immunantwort bestimmt.

Die infizierten Zellen produzieren Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), das sowohl in der selben als auch in benachbarten Zellen zur Expression verschiedener IFN- $\alpha$ -regulierter Gene führt, sodass die

## Einleitung

Virusreplikation gehemmt und Virus-DNA zerstört wird<sup>26</sup>. Ferner werden so verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen aktiviert. Die Virusantigene führen weiter zur Aktivierung der dendritischen Zellen, welche in regionale Lymphknoten wandern, um dort über MHC-II diese Virusantigene zu präsentieren und so die T-Helfer-Zellen, die zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen zu stimulieren. Die aktivierten B-Zellen bilden Antikörper vorrangig gegen die Proteine HBcAg und HBeAg. Diese Immunglobuline sollen freie Viren binden, damit diese über Ig-spezifische Rezeptoren von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen und phagozytiert werden können.

Zudem wird durch die Antikörper, die an der Zelloberfläche exprimierter Viruspartikel gebunden haben, das Komplementsystem aktiviert, was wiederum zur Lyse infizierter Zelle führt. Die humorale spielt gegenüber der zellulären Immunantwort bezüglich der Ausheilung der HBV-Infektion eher eine untergeordnete Rolle<sup>27</sup>.

Bei einer starken T-Zell-Antwort kann es zur vollständigen Viruselimination und Ausheilung kommen. Bei einer schwachen T-Zellantwort hingegen wird durch ineffektive Hemmung der Virusvermehrung die Persistenz des Virus bedingt. Aufgrund der weitgehenden Unreife des frühkindlichen Immunsystems, persistiert das Virus in 90% der Infektionen im Kindesalter.

Der Angriff infizierter Zellen im Rahmen der Immunantwort führt zu einer Entzündung der Leber, der Hepatitis. Histopathologische Korrelate sind periportale Nekrosen mit monozytären Infiltraten und beim chronischen Krankheitsverlauf fibrotische bzw. zirrhotische Umbauvorgänge<sup>28</sup>. Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass auch extrahepatische Zellen wie zum Beispiel Monozyten oder Knochenmarkszellen von HBV infiziert werden<sup>29-31</sup>.

### ***1.7 Serummarker der Hepatitis-B-Virusinfektion***

Im Folgenden werden die virologischen Parameter und deren Bedeutung für die Diagnostik dargestellt. Bisher etablierte Marker sind die HBV-DNA, die Virusproteine HBsAg, HBeAg sowie die Antikörper anti-HBs, anti-HBe und anti-HBc. Ein weiterer Marker könnte die HBV-RNA im Serum sein, dessen Untersuchung Ziel dieser Arbeit ist.

#### **1.7.1 HBV-DNA**

Die HBV-DNA ist der wichtigste Marker für die Einschätzung der Kontagiosität des Patienten und für das Therapiemonitoring einer chronischen Hepatitis B. Der quantitative Nachweis von HBV-DNA kann durch verschiedene Testmethoden, wie ein Hybridisierungsassay oder eine PCR, erfolgen. Die Höhe der HBV-DNA im Serum un behandelter Patienten ist zudem der wichtigste prognostische Faktor für den Krankheitsverlauf. So konnte gezeigt werden, dass eine

lineare Korrelation zwischen der Höhe der HBV-DNA und der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Leberzirrhose bzw. eines HCCs besteht<sup>5</sup>.

### **1.7.2 Hepatitis-B-Surface-Antigen**

Das Oberflächenprotein Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg), das sich aus den Proteinen L, M und S zusammensetzt, ist bereits 1 - 10 Wochen nach Infektion nachweisbar und damit ebenfalls Ausdruck für die Kontagiosität. Allein der qualitative Nachweis genügt für die HBV-Diagnose und potentielle Infektiosität. Es kann auch ein quantitativer HBsAg-Wert ermittelt werden. Ein hoher HBsAg-Titer wird als negativer prädiktiver Wert bezüglich des Therapieansprechens angesehen<sup>32</sup>. Wird das HBsAg unter Therapie unter die Nachweisgrenze supprimiert oder tritt gar eine Serokonversion von HBsAg zu anti-HBs auf, kann von einer klinischen Ausheilung der HBV-Infektion gesprochen werden. Im Zellkern der Hepatozyten bleibt jedoch lebenslang die HBV cccDNA erhalten<sup>4</sup>.

### **1.7.3 Anti-HBs-Antikörper**

Der Nachweis von Anti-HBs-Antikörper (anti-HBs) im Verlauf einer HBV-Infektion ist Ergebnis einer HBs-Serokonversion und zeigt als wichtigster Parameter die Eliminierung (Ausheilung) der HBV-Infektion an. Darüber hinaus ist der Antikörpertiter Ausdruck einer Immunantwort auf eine erfolgreiche HBV-Impfung.

### **1.7.4 Hepatitis-B-E-Antigen**

Das Hepatitis-B-E-Antigen (HBeAg) stellt die proteolytisch verkürzte und damit lösliche Form des Core-Proteins (HBcAg) dar. Der Nachweis von HBeAg im Serum spricht für eine hohe Virusreplikationsrate. Damit verbunden ist eine hohe Kontagiosität und die erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines chronischen HBV-Infektion<sup>33</sup>.

### **1.7.5 Anti-HBe-Antikörper**

Die Bildung von Anti-HBe-Antikörper (anti-HBe) tritt in 2 – 10% der Fälle spontan auf und ist zum anderen eines der Erfolgsparameter unter Therapie<sup>4</sup>. Die HBe-Ag-Serokonversion ist ein Endpunkt der antiviralen Behandlung und wird in Abhängigkeit vom Therapeutikum, Erkrankungsalter und der Therapiedauer in 10 – 45% der Behandlungen erreicht<sup>4</sup>.

### **1.7.6 Anti-HBc-Antikörper**

Antikörper gegen HBcAg sind bei jedem Patienten mit einer frischen und oder ausgeheilten HBV-Infektion nachweisbar: In der akuten Phase finde man hohe Titer des anti-HBc-IgM,

## Einleitung

welche nach 6 Monaten wieder abfallen. Im chronischen Verlauf oder auch nach ausgeheilter Infektion ist anti-HBc-IgG nachweisbar.

Die Tabelle 2 und Abbildung 4 geben die entsprechenden Parameterkonstellationen und die zeitlichen Verläufe der akuten und chronischen HBV-Infektion wieder.

Tab. 2 Virologische Parameter der Hepatitis B.

Bei der Angabe „+“ (positiv) ist der jeweilige Parameter im Serum nachweisbar, analog bei „-“, (negativ) nicht. Bei HBeAg-positiven Trägern ist antiHBe in der Regel negativ und umgekehrt.

|                   |                      | HBV-DNA | HBsAg | anti-HBs | HBeAg   | anti-HBe | anti-HBcIgM | anti-HBcIgG |
|-------------------|----------------------|---------|-------|----------|---------|----------|-------------|-------------|
| Akute Hepatitis   |                      | +       | +     | -        | + / (-) | -        | +           | +           |
| Chron. Hepatitis: | Immunaktiv           | +       | +     | -        | + / - * | - / + *  | -           | +           |
|                   | Inaktiver HBs-Träger | -       | +     | -        | -       | +        | -           | +           |
| Z. n. Hepatitis B |                      | -       | -     | +        | -       | - / (+)  | -           | +           |
| Z. n. HBV-Impfung |                      | -       | -     | +        | -       | -        | -           | -           |

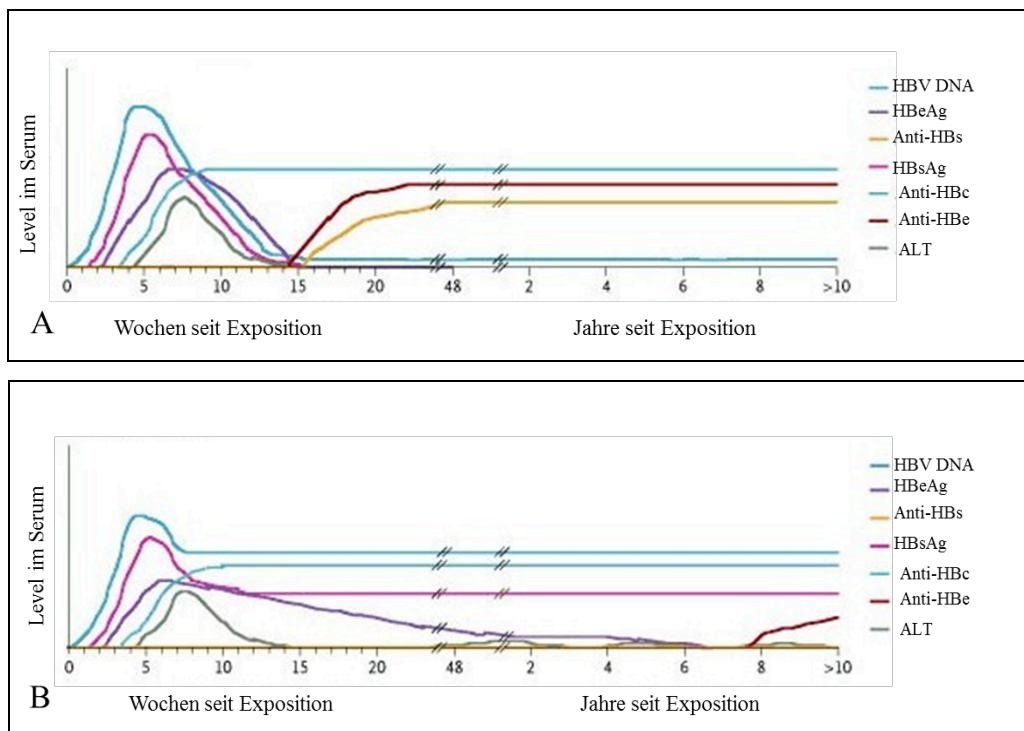


Abb. 4 Serologischer Verlauf der Marker der HBV-Infektionen,  
**A** Akute Infektion, **B** Chronische Infektion, modifiziert nach Vernazza<sup>34</sup>.



### **1.7.7 HBV-RNA als neuer Serummarker**

Die Arbeitsgruppe um Hilger veröffentlichte 1991 den Nachweis von HBV-mRNA-Formen aus Leberbiopsaten von Patienten mit HCC auf Grundlage einer chronischen HBV-Infektion.

Die mRNA im Allgemeinen enthält am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz, der aus 30 - 200 Adenin-Nukleotide besteht, der die mRNA vor einem enzymatischen Abbau schützt und den Export der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma erleichtert. Zur Aktivierung der Polyadenylierung TATAAA an Position 1789 nt bedarf es eines Signals, das für alle mRNAs des HBV an derselben Stelle liegt. Schutz et al. beschrieben ein zweites Polyadenylierungssignal mit dem Motiv CATAAA an Position 1661 nt, dessen Aktivierung zu am 3'-Ende verkürzten mRNAs führt<sup>35</sup>.

Hilger und Mitarbeitern gelang erstmals der Nachweis eines verkürzten HBV-Transkripts, welches sie truncated („trunkierte“) RNA (trRNA) nannten<sup>14,35</sup>. Die nach Aktivierung des bekannten Polyadenylierungssignals entstehende Gesamtlängen-HBV-RNA wurde als full-length („Gesamtlängen-“) RNA (flRNA) bezeichnet. Zur Detektion der HBV-mRNAs nutzten sie oligo(dT)-Primer, die den Poly(A)-Schwanz gebunden haben. Die biologische Funktion dieses verkürzten HBV-RNA-Fragments ist bislang unklar.

Unvollständige Viruspartikel, die HBV-RNA enthielten, konnten erstmals von Köck et al. (1996) im Serum von infizierten Patienten nachgewiesen werden<sup>36</sup>.

In wenigen bisher veröffentlichten Arbeiten wurde die Nachweisbarkeit und zum Teil auch Quantifizierung von HBV-RNA im Serum untersucht<sup>37-42</sup>.

Der Anstieg von HBV-RNA im Serum während einer antiviralen Behandlung mit Lamivudin wurde als möglicher Prädiktor einer Lamivudinresistenz beschrieben<sup>43</sup>. Eine Assoziation von HBV-RNA-Spiegeln mit Ansprechen auf eine antivirale Behandlung wurde bislang nicht beschrieben.

## **1.8 Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion**

### **1.8.1 Therapie der akuten HBV-Infektion**

Akut verlaufende HBV-Infektionen weisen eine hohe Spontanheilungsrate (> 90% der Infektionen) auf, sodass keine Therapieindikation gegeben ist. Studien konnten keinen Vorteil der antiviralen Behandlung zeigen. Eine Ausnahme bilden 0,1 – 0,5% der Fälle mit fulminanter Hepatitis B. Bei Anzeichen einer Lebersynthesestörung sollte eine orale antivirale Therapie mit einem Nukleos(t)id-Analogon eingeleitet werden, um einem Leberversagen entgegenzuwirken<sup>4</sup>.

### 1.8.2 Therapie der chronischen HBV-Infektion

Gemäß der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur HBV-Infektion sollten Patienten mit chronischer Hepatitis B therapiert werden, wenn folgende Kriterien gegeben sind:<sup>4</sup>

- Virusreplikation von  $\geq 2000$  IU/ml und
- wiederholt erhöhte Transaminasen (GPT bzw. ALT) oder Fibrose,
- erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer Leberzirrhose oder eines HCC.

Bei der Auswahl des Therapieschemas sind die Begleiterkrankungen des Patienten und das Nebenwirkungsspektrum der Medikamente zu berücksichtigen. Für die Behandlung der Hepatitis B stehen Interferone sowie Nukleos(t)id-Analoga zur Verfügung (Tabelle 3). Letztere hemmen die reverse Transkriptaseaktivität der viralen DNA-Polymerase und damit die Synthese des DNA-Plusstranges. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit sind sie weltweit die am häufigsten eingesetzten Substanzen. Interferon-alpha wirkt über immunmodulatorische Effekte und ist mit teilweise starken Nebenwirkungen assoziiert<sup>6,26</sup>.

Tab. 3 Zugelassene Medikamente zur Therapie der chronischen HBV (Stand 2011).

| Wirkstoffgruppe       | Wirkstoff                       | Handelsname |
|-----------------------|---------------------------------|-------------|
| $\alpha$ -Interferone | Interferon-apha-2a              | Roferon®    |
|                       | Interferon-alpha-2b             | Intron A®   |
|                       | Pegyliertes Interferon-alpha-2a | Pegasys®    |
| Nukleosidanaloga      | Lamivudin                       | Zeffix®     |
|                       | Entecavir                       | Baraclude®  |
|                       | Telbivudin                      | Sebivo®     |
| Nukleotidanaloga      | Adefovir dipivoxil              | Hepsera®    |
|                       | Tenofovir Disoproxil Fumarat    | Viread®     |

Therapieziele sind<sup>4</sup>:

- die Reduktion der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze eines hochsensitiven Assays  
Durch den Einsatz von hochwirksamen Nukleos(t)id-Analoga (wie Entecavir oder Tenofovir) kann dies bei fast allen Patienten in der Langzeittherapie erreicht werden.
- die dauerhafte HBe-Serokonversion (Verlust des HBeAg und Bildung von anti-HBe-Antikörpern). Nach HBeAg-Serokonversion besteht bei den meisten Patienten eine ausreichende immunologische Kontrolle der HBV-Replikation und die antivirale

## Einleitung

Behandlung muss nicht mehr fortgeführt werden. Eine HBeAg-Serokonversion kann unter Langzeittherapie mit Nukleos(t)id-Analoga bei bis zu 50% der Patienten erreicht werden<sup>44</sup>.

- der Verlust des HBsAg oder die HBsAg-Serokonversion. Ein HBsAg-Verlust wird als klinische Heilung der HBV-Infektion angesehen. Eine antivirale Behandlung ist nicht mehr notwendig.
- die Normalisierung der Transaminasen, insbesondere der Alanintransaminase (ALT) und eine Abnahme der entzündlichen Aktivität und des Fibrorestadiums. Langfristig soll so die Entstehung einer Leberzirrhose, die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms, die Notwendigkeit einer Lebertransplantation und der Tod verhindert werden.

Nukleos(t)id-Analoga verdrängen kompetitiv die natürlichen Substrate der DNA-Synthese (dNTPs) und führen bei der reversen Transkription der prägenomischen HBV-RNA zu einem Abbruch der DNA-Kette. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit können diese über viele Jahre eingenommen werden.

In einer Studie von Marcellin et al. von 2008 erreichten unter Tenofovir-(TDF-)Therapie 76 - 83% der HBeAg-positiven Patienten mit chronischer HBV-Infektion eine Reduktion der zirkulierenden HBV-DNA unter 400 Kopien/nl. Allerdings erreichten nur 23% der HBeAg-positiven Patienten eine HBeAg-Serokonversion erreichen und eine HBsAg-Serokonversion wurde nur bei 3,2% der Patienten beobachtet. Durch die Therapie mit TDF konnte bei 93 - 97% der HBeAg-negative Patienten die Suppression der HBV-DNA und die Nachweisgrenze beobachtet werden, allerdings zeigte sich bei keinem der Patienten eine HBsAg-Serokonversion<sup>45</sup>. Bei Patienten unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga hingegen konnte nur ein Abfall des HBsAg im Serum bei sehr wenigen (etwa 10%) HBeAg-positiven Patienten gezeigt werden<sup>46</sup>.

### **1.8.3 Gründe für das fehlende Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion**

Zeigt sich drei Monate nach Einleitung der antiviralen Therapie kein oder nur ein geringer Abfall der HBV-DNA (weniger als Zehntel der Viruslast vor Therapie), spricht man von einem primären Therapieversagen.

Folgt einem initialen Abfall der HB-Viruslast unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie ein Anstieg der HBV-DNA um mehr als ein Zehntel ( $>1 \log_{10}$ ), besteht der Verdacht auf die Entwicklung einer HBV-Resistenz gegen die verwendete Substanz<sup>4</sup>. Unter Ausschluss mangelnder

Patientencompliance ist die Ursache dessen meist eine Resistenzentwicklung des Virus gegenüber dem Medikament. Unter Behandlung mit Lamivudin kommt es bereits nach einem Jahr bei 15 - 23% der Patienten zur Entstehung von Resistenz-assoziierten Mutationen. Nach 5 Jahren Therapie liegt die Resistenzrate bereits bei 65%<sup>47</sup>. Auch für die anderen Nukleos(t)id-Analoga haben Studien klinische Resistenzentwicklungen bei steigender Therapiedauer mit virologischem Durchbruch gezeigt. Eine Ausnahme stellt bisher das seit 2008 zur Therapie der chronischen Hepatitis B zugelassene TDF dar.

### **1.8.4 Offener medizinischer Bedarf in der Behandlung chronischer HBV-Infektionen mit Nukleos(t)id-Analoga**

Patienten mit chronischer HBV-Infektion erhalten in der Regel eine antivirale Therapie mit hochwirksamen Nukleos(t)id-Analoga, unter der bei fast allen Patienten ein starker Abfall der HBV-DNA bis unter die Testnachweisgrenze erreicht werden kann<sup>48</sup>.

Die Synthese der pgRNA, die Transkription der RNA von der cccDNA und die Translation der viralen Proteine werden nur gering von den Nukleos(t)id-Analoga beeinflusst<sup>49</sup>. Das erklärt z.B. hohe HBsAg-Konzentrationen im Serum unter Therapie trotz starkem Abfall der Viruslast unter antiviraler Therapie.

Immunologische Kontrolle der Erkrankung durch HBeAg- / HBsAg-Serokonversionen wird jedoch nur von einer bestimmten Subgruppe von HBeAg-positiven Patienten erreicht und lässt sich nicht sicher vorhersagen, sodass die Behandlungsdauer für alle Patienten zunächst unbestimmt und im Zweifel lebenslang ist.

Die fehlende Vorhersage der Therapiedauer ist ein Grund dafür, dass von einer Behandlung vor allem junger Patienten oft abgesehen wird<sup>4</sup>. Auch für experimentelle Therapieansätze (z.B. die Kombination von Nukleos(t)id-analoga und pegyliertem Interferon-alpha-2a), die auf eine Erhöhung der Rate des immunologischen Ansprechens abzielen und die in der Zukunft auch für HBeAg-negative Patienten höhere Raten von serologischem Ansprechen bewirken könnten, gibt es bislang keine etablierten frühen Response-Marker. Ferner könnte die Vorhersage einer serologischen Response und somit einer definierten Behandlungsdauer generell die Compliance der Patienten stärken um die Therapieziel zu erreichen.

## 2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Assoziation von HBV-RNA im Serum mit serologischem Ansprechen bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion untersucht werden, die bereits ein virologisches Ansprechen unter einer laufenden Behandlung mit Nukleos(t)id-Analoga gezeigt haben. Da unter antiviraler Behandlung mit aktuell verfügbaren Nukleos(t)id-Analoga nahezu alle Patienten ein virologisches Ansprechen im Sinne einer kompletten Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze erreichen, aber ein HBsAg-Verlust bzw. eine HBsAg-Serokonversion sehr selten sind, wird zur Vorhersage vom serologischen Ansprechen die HBeAg-Serokonversion als Endpunkt gewählt. Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von HBeAg und der Höhe der HBV-RNA wurde bereits in der Arbeit von Su et al., 2001, hingewiesen<sup>37</sup>.

Zur Untersuchung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung sollte:

1. ein sensitiver Assay zum selektiven Nachweis von HBV-RNA im Serum etabliert werden,
2. HBV-RNA aus sequentiellen Serumproben eines gut charakterisiertes Patientenkollektivs analysiert werden und
3. eine statistische Bewertung der HBV-RNA sowie anderer Marker bezüglich ihrer Assoziation mit dem serologischen Therapieansprechen durchgeführt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Lightcycler 1.5 und 2.0, Software Version 3.5 (Roche)
- 20 µl-Glaskapillaren für Lightcycler (Roche)
- Lightcycler-Karussell (Roche)
- Lightcycler-Zentrifuge (Roche)
- Thermocycler Mastercycler (Eppendorf)
- FlexCycler (Analytikjena)
- 0,2 ml; 0,5ml- und 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstaedt)
- Tischzentrifuge (Eppendorf)
- Horizontales Agarosegel-Elektrophoresesystem (Wealtec Europe)
- Geldokumentationssystem (Biometra)
- Pipetten + Filterspitzen (Eppendorf, Sarstaedt)
- Brutschrank (Heraeus)
- Heizblock (Techne)
- Brunswickschüttler (New Brunswick Scientific)
- Kapillarsequenzier 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Nano Drop 2000 (Thermo Scientific)
- pH-Meter
- Rührer
- Autoklav
- Agarplatten

### 3.2 Reagenzien

#### 3.2.1 Allgemein verwendete Chemikalien

Tab. 4 Verwendete Chemikalien.

| Chemikalie          | Firma                 | Katalog-nummer | Verwendungszweck                                  |
|---------------------|-----------------------|----------------|---|
| Ethanol, absolute   | Mallinckrodt<br>Baker | 3406.5000      | Lösungsmittel für<br>Nukleinsäurepräparation      |
| EDTA, 500 mM        | ICN<br>Biomedicals    | 800682         | Komplexbilder zum Abstoppen<br>des DNase-Reaktion |
| Ammoniumacetat, 5 M | Carl Roth             | 7869.1         | RNA-Fällung                                       |
| Glycogen            | Roche                 | 10901393001    | RNA-Fällung                                       |
| Nuclease-Free Water | Promega               | P1193          | Verdünnung  |

#### 3.2.2 Reagenzien und Herstellung verwendeter Puffer und Nährmedien

Tab. 5 Übersicht der Puffer und Nährmedien.

| Puffer / Nährmedium                                 | Zusammensetzung  |
|---|--|
| 10 X TBE-Puffer (pH 8,0)                            | 108 g Tris-Base<br>55 g Borsäure<br>20 ml 1 M EDTA,<br>ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen   |
| λ-TE-Puffer   | 10 µg/ml λ-DNA   |
| LB-Agar-Ampicillin-Platten mit Ampicillin und X-Gal | 10 g NaCl<br>10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>15 g Agar<br>ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen<br>Rühren und Autoklavieren<br>2,0 ml Ampicillin<br>1,25 ml X-Gal<br>Platten gießen und erkalten lassen   |
| SOC-Medium  | 20 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>0,5 g NaCl<br>10 ml 0,25 M KCl<br>10ml 1 M MgCl <sub>2</sub><br>20 ml 1M Glucose<br>ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen<br>mit NaOH pH 7,0 einstellen und autoklavieren |

Die Chemikalien stammten von den Firmen Carl Roth, MP Biomedicals, Biochrom AG, Becton Dickinson GmbH und JT Baker.

### 3.2.3 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

Tab. 6 Übersicht der Reagenzien für Nukleinsäurepräparation, -analyse und -amplifikation.

| Kit / Enzym  | Firma          | Katalognummer  | Verwendungszweck                               |
|--|----------------|----------------|--|
| High Pure Viral Nucleic Acid Kit                         | Roche          | 11 858 874 001 | Präparation von Nukleinsäuren                  |
| RNA, 16 S- and 23 S-ribosomal from <i>E. coli</i> MRE600 | Roche          | 10206938001    | Präparation von Nukleinsäuren                  |
| NucleoSpin® Plasmid Mini Prep                            | Macherey-Nagel | 740615.50      | Präparation von Plasmiden                      |
| New NucleoBond® Xtra Midi                                | Macherey-Nagel | 740410.100     | Präparation von Plasmiden                      |
| MiniElute Gel Extraction Kit für Gelextraktion           | Qiagen         | 28606          | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel |
| Turbo™ DNase (2 U/μl)                                    | Ambion         | AM2238         | DNA-Abbau                                      |
| RiboPure™-Blood Kit                                      | Ambion         | AM1928         | Aufreinigung von RNA aus Blut                  |
| StrataClone PCR Cloning Kit                              | Stratagene     | 240205         | Klonierung von PCR-Produkten                   |
| StrataClone SoloPack Competent Cells                     | Stratagene     | 200185-41      | Kompetente <i>E. coli</i> für Transformation   |



## Material und Methoden

| <b>Kit / Enzym</b>   | <b>Firma</b>          | <b>Katalognummer</b> | <b>Verwendungszweck</b>   |
|--|-----------------------|----------------------|---|
| <i>Eco</i> RI (10 U/μl) und Puffer (10 x)                  | Fermentas             | ER0271<br>B12        | DNA Restriktions-<br>endonuklease für<br>DNA-Spaltung                               |
| SuperScript™ III Reverse Transcriptase                     | Invitrogen            | 18080-085            | RNA-abhängige DNA-<br>Polymerase für reverse<br>Transkription                       |
| GeneAmp® (10 mM) dNTP Mix Blend                            | Applied<br>Biosystems | N8080260             | Desoxyribonukleotid-<br>triphosphat-Mix für<br>DNA-Synthese (RT-<br>Reaktion, PCR)  |
| Primer Random (p(dN) <sub>6</sub> ; “random Primer”)       | Applied<br>Biosystems | 11034731001          | Zufallsprimer-Mix<br>(Hexanukleotidtri-<br>phosphate) für RT-<br>Reaktion           |
| GeneAmp® (12,5mM) dNTP Blend with dUTP                     | Applied<br>Biosystems | N8080270             | Desoxyribonukleotidtri-<br>phosphat-Mix für<br>DNA-Synthese (PCR<br>mit UDG-Option) |
| Protector RNase Inhibitor                                  | Roche                 | 03335402001          | Hemmung von RNasen  |
| Lightcycler Fast Start DNA Master <sup>plus</sup> HybProbe | Roche                 | 03 515 567 001       | 5 X Reaktionsmix für<br>PCR im Lightcycler  |
| AmpliTaq Gold DNA Polymerase mit Puffer II                 | Applied<br>Biosystems | N8080153             | DNA Polymerase für<br>PCR am Blockcycler  |
| 6 X DNA Loading Dye Solution                               | Fermentas             | R1151                | Probenauftragungs-<br>puffer für Agarosegel-<br>Elektrophorese                      |
| GeneRuler™ 100bp DNA Ladder                                | Fermentas             | SM0241               | DNA-Längenmarker<br>für Agarosegel-<br>Elektrophorese                               |

| <b>Kit / Enzym</b>                                     | <b>Firma</b>       | <b>Katalognummer</b> | <b>Verwendungszweck</b>                       |
|--|--------------------|----------------------|---|
| GoldView II  | Solarbio           | TEN129038            | Farbstoff für Anfärbung von DNA im Agarosegel |
| ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems | 4337450              | Reaktionsmix für Sequenzierungsreaktion       |
| Hi-Di <sup>-</sup> -Formamide (Highly deionized)       | Applied Biosystems | 4311320              | DNA-Lösungsmittel für Sequenzierung           |

### 3.3 Primer und Sonden

#### 2.3.1 Primer

Tab. 7 Übersicht der Primer.

| <b>Name</b> | <b>Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')</b>                             | <b>Funktion</b>  |
|-------------|---|--|
| PxT1tr      | (dT) <sub>17</sub> GDT GGT G  | Spezifische reverse Transkription und PCR der trRNA <sup>14</sup>                              |
| PxT2tr      | GAG ACT CGA CTC CAC AAC CA<br>(dT) <sub>17</sub> GDT GGT G          | Spezifische reverse Transkription der trRNA, Primerbindungsregion in PCR mit trcDNA            |
| PxT3tr      | GAG ACT CGA CTC CAC AAC CA<br>(dT) <sub>17</sub> GDT GGT GMR CAG AC | Optimierte spezifische reverse Transkription der trRNA; Primerbindungsregion in PCR mit trcDNA |
| Pxtrs       | GAG ACT CGA CTC CAC AAC CA  | PCR mit trcDNA   |
| Pxtras      | CCG ACC TTG AGG CMT ACT TC  | PCR mit trcDNA   |
| PxT2fl      | ACC ACG CTA TCG CTA CTC AC<br>(dT) <sub>17</sub> GWA GCT C          | Spezifische reverse Transkription der flRNA, Primerbindungsregion in PCR mit flcDNA            |

| Name               | Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')                                | Funktion                                 |
|--------------------|---|--|
| Pxfls              | ACC ACG CTA TCG CTA CTC AC                                      | PCR mit flcDNA                           |
| Pxflas             | CAA CTT TTT CAC CTC TGC CTA                                     | PCR mit flcDNA                           |
| PxICtrs            | GAG ACT CGA CTC CAC AAC CA<br>AAG CCT CAATAA AGC TTG CCT<br>TGA | PCR zur Herstellung der trIC             |
| PxICtras           | CCG ACC TTG AGG CMT ACT TC<br>GTT CGG GCG CCA CTG CTA G         | PCR zur Herstellung der trIC             |
| PxICfls            | ACC ACG CTA TCG CTA CTC AC<br>AAG CCT CAATAA AGC TTG CCT<br>TGA | PCR zur Herstellung der flIC             |
| PxICflas           | CTT TTT CAC CTC TGC CTA GTT<br>CGG GCG CCA CTG CTA G            | PCR zur Herstellung der flIC             |
| M13 Reverse primer | GGA AAC AGC TAT GAC CAT G                                       | Sequenzierung der klonierten ICs und PKs |
| M13-20 Primer      | GTA AAA CGA CGG CCA GT  | Sequenzierung der klonierten ICs und PKs |

### 2.3.2 Hydrolysesonden

Tab. 8 Übersichten über die verwendeten Hydrolysesonden

| Name       | Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')                          | Funktion             |
|------------|---|----------------------|
| F5B3-xtr   | FAM-5'-CAG ACC AAT TTA TGC CTA<br>CAG CCT CC-BHQ-1        | Detektion der trcDNA |
| 5FB3-xfl   | FAM-5'-CAT GTC CYA CTG TTC AAG<br>CCT CCA AG-BHQ-1        | Detektion der flcDNA |
| λ IC-Sonde | DYXL-5'-ACC TTA CCG AAA TCG GTA<br>CGG ATA CCG C-3'-BHQ-2 | Detektion der IC     |

### ***3.4 Plasmide***

Die Plasmide pSC trPK, pSC flPK sowie pSC trIC und pSC flIC wurden durch Klonieren von spezifischen Sequenzen in den Vektor pSC-A amp/kan (4270 bp; StrataClone PCR Cloning Kit, Stratagene) hergestellt.

### ***3.5 Molekularbiologische Methoden***

#### **3.5.1 Präparation der Nukleinsäuren aus Serum**

Die viralen Nukleinsäuren wurden mit High Pure Viral Nucleic Acid Kit nach Angaben des Herstellers aus je 200 µl Serumproben isoliert. Anstelle der im Kit enthaltenen poly(A)-RNA wurden 4,0 µl 16 S- und 23 S-ribosomale RNA in einer Konzentration von 80 µg / ml Probe eingesetzt, um eine Hybridisierung der Primer mit Oligo(dT)-Sequenz an freie pol(A)-RNA auszuschließen. Außerdem wurde nach der Zellyse jeweils eine interne DNA-Kontrolle zugesetzt, sodass je eine Zielkonzentration von 100 Kopien pro PCR-Ansatz erreicht wurde.

#### **3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel**

Zur Analyse bestimmter DNA-Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel (Abschnitt 3.5.7) wurden diese mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem MinElute Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **3.5.3 Herstellung DNA-freier RNA-Proben**

Unter Einsatz der Turbo DNase wurden DNA-freie Proben erzielt. Zu 40 µl der DNA-RNA-Lösung wurden 2 µl Turbo-DNase und 4 µl DNase-Puffer gegeben. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C für 30 min. Um die Reaktion zu stoppen wurde nach Zusatz von 1,3 µl EDTA (500 mM) der Reaktionsansatz 10 min bei 75 °C im Heizblock inkubiert. Die Aufreinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen RNA erfolgte anschließend mit dem RiboPure™-Blood Kit. Hierfür wurden 20 µl RNA-haltige Lösung mit 80 µl „Elution buffer“, 350 µl „Binding solution“ und 250 µl Ethanol (absolut) versetzt. Das Gemisch wurde auf ein Reinigungssäulchen gegeben und bei 13000 U / min für 10 Sekunden zentrifugiert. Die Ablösung der RNA von der Säule erfolgte mit 100 µl „Elution buffer“ und Zentrifugation bei 13000 U / min für 30 Sekunden.

#### **3.5.4 Fällung der RNA**

Zur Konzentrierung von isolierter RNA wurde diese gefällt. Hierzu wurden 100 µl der RNA-Lösung mit 10 µl Ammoniumacetat (5 M), 2 µl Glycogen und 250 µl Ethanol (absolut) versetzt

und für 30 min bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 12.000 U / min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 10 µl Nuclease-Free Water gelöst.

### 3.5.5 Reverse Transkription

#### 3.5.5.1 Reverse Transkription mit Random Primern

Die Umschreibung der RNA in cDNA unter Verwendung von Zufallsprimern erfolgte im Flex-Cycler unter folgenden Bedingungen<sup>50</sup>:

Tab. 9 Zusammensetzung des 20 µl-RT-Reaktionsansatzes mit Random Primern.

| Reagenz                       | Volumen | Konzentration im Reaktionsansatz |
|-------------------------------|---------|----------------------------------|
| Nuclease-Free Water           | 1,0 µl  | -                                |
| 5 X RT-Puffer                 | 4,0 µl  | 1 X                              |
| DTT (0,1 M)                   | 1,0 µl  | 5,0 mM                           |
| 10mM dNTP Mix (je 2,5 mM)     | 1,0 µl  | 0,5 mM                           |
| RNase Inhibitor (40 U/µl)     | 1,0 µl  | 40,0 U                           |
| SuperScript III (200 U/µl) RT | 1,0 µl  | 200,0 U                          |
| Random Primer (600 ng/µl)     | 1,0 µl  | 30,0 mM                          |
| RNA                           | 10,0 µl |                                  |

Tab. 10 Protokoll für RT-Reaktion im Flex-Cycler.

| Reaktionsschritt                  | Temperatur | Zeit   |
|-----------------------------------|------------|--------|
| Primer Annealing                  | 25 °C      | 5 min  |
| Reverse Transkription             | 50 °C      | 35 min |
| Inaktivierung der SuperScript III | 96 °C      | 2 min  |
| Kühlung                           | 4,0°C      | ∞      |

#### 3.5.5.2 Reverse Transkription mit spezifischen Primern

Um einen DNA-Verdau zu vermeiden, wurde eine RACE-PCR zur Amplifikation der HBV-RNA-Formen entwickelt<sup>51</sup>.

Die gezielten Umschreibungen wurden mit spezifischen oligo(dT)-Primern durchgeführt (PxT1tr, PxT2tr oder PxT3tr bzw. PxT1fl und PxT2fl).

Die Entwicklung der Primer ist Teil der Ergebnisse und unter 3.2.2 dargestellt. An dieser Stelle werden die Standardzusammensetzung des Ansatzes und das Protokoll der RT aufgeführt.

Die isolierte RNA wurde hierfür mit Primern für 5 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert und dann sofort auf Eis gelagert um Sekundärstrukturen aufzuheben. Das Pipettieren des vollständigen RT-Reaktionsansatzes erfolgte anschließend ebenfalls auf Eis. Die Umschreibung fand im Thermocycler Mastercycler unter folgenden Bedingungen statt:

Tab. 11 Zusammensetzung des 20 µl-RT-Reaktionsansatzes mit spezifischen Primern.

| Reagenz  | Volumen | Konzentration im Reaktionsansatz |
|--|---------|----------------------------------|
| Nuclease-Free Water  | 1,0 µl  |                                  |
| 5 X RT-Puffer  | 4,0 µl  | 1 X                              |
| DTT (0,1 M)  | 1,0 µl  | 5,0 mM                           |
| 10mM dNTP Mix (je 2,5 mM)                                    | 1,0 µl  | 0,5 mM                           |
| RNase Inhibitor (40 U/µl)                                    | 1,0 µl  | 40,0 U                           |
| SuperScript III (200 U/µl) RT                                | 1,0 µl  | 200,0 U                          |
| Primer PxT1tr, PxT2tr, PxT3tr, PxT1fl<br>oder PxT2fl (10 µM) | 1,0 µl  | 50,0 µM                          |
| RNA  | 10,0 µl |                                  |

Tab. 12 Protokoll für RT-Reaktion im Blockcycler.

|                                   | Temperatur | Zeit   |
|-----------------------------------|------------|--------|
| Primer Annealing                  | 25,0 °C    | 5 min  |
| Reverse Transkription             | 52,7 °C    | 60 min |
| Inaktivierung der SuperScript III | 70,0 °C    | 15 min |
| Kühlung                           | 4,0 °C     | ∞      |

### 3.5.6 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR wurde im Flex-Cycler zur qualitativen Analyse unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 13 Zusammensetzung des 50 µl-PCR-Reaktionsansatzes.

| Reagenz                           | Volumen  | Konzentration im Reaktionsansatz |
|-----------------------------------|----------|----------------------------------|
| Nuclease-Free Water               | 30,75 µl |                                  |
| Puffer II (10 X)                  | 5,0 µl   | 1 X                              |
| dNUTP Mix (je 2,5 mM)             | 4,0 µl   | 0,200 mM                         |
| MgCl <sub>2</sub> , 25 mM         | 4,0 µl   | 2,0 mM                           |
| Primer Pxtrs oder Pxfls (10 µM)   | 2,0 µl   | 0,4 mM                           |
| Primer Pxtras oder Pxflas (10 µM) | 2,0 µl   | 0,4 mM                           |
| AmpliTaQ Gold (5 U/µl)            | 0,25 µl  | 1,25 U                           |
| tr/flcDNA                         | 2,0 µl   |                                  |

Tab. 14 PCR-Protokoll für Flex Cycler.

| Reaktionsschritte                           | Temperatur | Zeit   |
|---|------------|--------|
| Taq-Aktivierung<br>Amplifikation: 40 Zyklen | 95,0 °C    | 10 min |
| Denaturierung                               | 94,0 °C    | 50 sec |
| Annealing                                   | 53,0 °C    | 1 min  |
| Elongation                                  | 72,0 °C    | 50 sec |
| Verlängerung                                | 72,0 °C    | 6 min  |
| Kühlung                                     | 4,0 °C     | ∞      |

### **Real-time-qPCR**

Der Nachweis von HBs-Gen-spezifischer RNA wurde nach der RT-Reaktion am LightCycler 2.0 mit einer RT-qPCR in zwei Schritten geführt. Dieser Assay wird für die quantitative Testung von Patientenproben auf HBV-DNA in der diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie der Charité eingesetzt. Hierfür wurden zunächst die aus der Serumprobe isolierten Nukleinsäuren einem DNase-Verdau unterzogen, der Ansatz aufgereinigt und die resultierende RNA mit Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben.

Tab. 15 Protokoll für RT-qPCR am LightCycler 2.0.

| Reaktionsschritte                  | Temperatur | Zeit    |
|------------------------------------|------------|---------|
| Aktivierung<br>Annealing 45 Zyklen | 95,0°C     | 10 min. |
| Denaturierung                      | 95,0°C     | 5 sec   |
| Elongation                         | 60,0°C     | 30 sec  |
| Kühlung                            | 4,0°C      | ∞       |

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist ein Teil der Ergebnisse und unter Abschnitt 4.2.7 dargestellt.

Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte im LightCycler 2.0 mit Hilfe der Lightcycler-Software 3.5. Da die eingesetzte HBV-spezifische TaqMan-Sonde mit dem Reporter-Farbstoff FAM markiert war, erfolgte der Nachweis von Target-Amplifikaten bei einer Wellenlänge von 530 nm.

### **3.5.7 Agarosegel-Elektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte**

Der Auftrennung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten erfolgten mittels Agarosegel-Elektrophorese. Dazu wurden 2%-ige Agarosegele hergestellt, indem 2 g Agarose in 100 ml

(1x)-TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst wurden. Anschließend wurden für die Anfärbung der DNA 4 µl GoldView in 100 ml Gellösung gegeben und diese auf den Gelträger gegossen. Zum Formen von Auftragsstellen wurde ein Kamm in den Gelträger gesetzt. Die DNA-Proben wurden jeweils in einem Verhältnis von 6:1 mit Loading Dye Solution versetzt und 10 µl in eine Auftragsstelle im Gel aufgetragen. Eine Auftragsstelle im Gel wurde mit dem DNA-Marker („100 bp DNA-Ladder“) beladen. Nach Überschichten des Gels mit TBE-Puffer erfolgte die Auftrennung der DNA im Agarosegel für etwa eine Stunde bei 100 V. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mittels Geldokumentationssystem gespeichert.

### **3.5.8 Klonierung von PCR-Produkten**

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der durch die Taq-Polymerase bei der Amplifikation generierte A-Basenüberhang genutzt. Der Einbau des PCR-Produktes erfolgte in den für die TA-Klonierung geeigneten Vektor pSC-A amp/kan. Anschließend wurden StrataClone SoloPack® kompetente *E.coli*-Zellen entsprechend der Angaben des Herstellers transformiert, auf Ampicillin- / X-Gal-haltigen LB-Platten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Auswahl potentieller Transformanten erfolgte zunächst anhand der Blau-Weiß-Selektion. Die daraus präparierten Plasmide wurden durch *EcoRI*-Verdau einerseits sowie Sequenzierung andererseits analysiert.

### **3.5.9 Präparation von Plasmiden**

Nach Kultivierung der Transformanten in je 3 ml LB-Amp-Medium unter Schütteln über Nacht wurde die entsprechende Plasmid-DNA unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid Mini / Midi Präp Kits nach Herstellerprotokoll präpariert.

### **3.5.10 *EcoRI*-Verdau von Plasmid-DNA**

Jeweils 4 µl Plasmidlösung (etwa 0,2 µg / µl) wurden mit 2 µl *EcoRI*-Puffer und 1,5 µl *EcoRI* versetzt und mit Nuclease-Free Water auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank.

Die Analyse der generierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese.



### 3.5.11 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde der BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet<sup>52</sup>. Entsprechend der Herstellerangaben zur Versuchsdurchführung hatte der Reaktionsansatz folgende Zusammensetzung:

Tab. 16 Zusammensetzung des 20 µl-PCR-Reaktionsansatzes.

| Reagenz              | Volumen | Konzentration im Reaktionsansatz |
|----------------------|---------|----------------------------------|
| Plasmid-DNA          | 1,0 µl  | 250 nM                           |
| Primer (5 µM)        | 1,0 µl  |                                  |
| Terminator Ready Mix | 4,0 µl  |                                  |
| Nuclease-Free Water  | 14,0 µl |                                  |
|                      | 20,0 µl |                                  |

Die Amplifikation der Plasmid-DNA wurde im Flex Cycler nach folgendem PCR-Protokoll durchgeführt:

Tab. 17 Protokoll für Sequenzierreaktion im Flex-Cycler.

| Reaktionsschritte        | Temperatur | Zeit   |
|--------------------------|------------|--------|
| Aktivierung              | 96,0 °C    | 2 min  |
| Amplifikation: 25 Zyklen |            |        |
| Denaturierung            | 96,0 °C    | 10 sec |
| Annealing                | 50,0 °C    | 5 sec  |
| Elongation               | 60,0 °C    | 4 min  |
| Kühlung                  | 4,0 °C     | ∞      |

Anschließend wurde die DNA gefällt. Dazu wurden dem Ansatz 80 µl Isopropanol (75%-ig) zugesetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 20 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands folgte ein Waschschrift mit 250 µl Isopropanol (75%-ig) und eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 U/min. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Pellet für 1 min bei 90 °C im Heizblock getrocknet. Dieses wurde anschließend mit 20 µl Hi-Di-Formamid für 3 min bei 90 °C im Heizblock behandelt und auf Eis gestellt. Die Sequenzanalyse erfolgte am 3130 Genetic Analyzer.

### 3.5.12 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts einer Lösung

#### Photometrische Bestimmung der Konzentration

Die Konzentrationsbestimmungen der Nukleinsäurelösungen wurden am Nano Drop 2000 durchgeführt. Für die Messung wurden 2 µl der jeweiligen Lösung eingesetzt. Die Konzentration wurde vom Messgerät in [ng / µl] angezeigt.

#### Berechnung der Viruslast

Ausgehend von der gemessenen Konzentration einer Plasmidlösung kann die entsprechende [Kopienzahl / ml] berechnet werden.

Die Umrechnung der DNA von [µg / ml] in [Kopien / ml] erfolgt über die AVOGADRO-Konstante (Anzahl von Atomen, Ionen oder Molekülen in 1 mol einer Substanz), die Größe der Nukleinsäure (Plasmid-DNA in bp) und die Molmasse eines Basenpaares (1 bp = 660 g / mol).

#### Molarität:

$$c \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{c_{\text{NanoDrop}} \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]}{M_W \times l \left[ \text{kb} \right]}$$

$c_{\text{NanoDrop}}$  ... Gemessene Konzentration am NanoDrop, [ng/µl]

$M_W$  ... Molekulargewicht je Basenpaar,  $M_W = 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$

$l$  ... Länge des Plasmids mit Insert, [bp]

$N_A$  ... AVOGADRO-Konstante,  $N_A = \frac{6,022 \times 10^{23}}{\text{mol}}$

#### Kopienzahl:

$$C \left[ \frac{\text{Kopien}}{\text{ml}} \right] = c \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] \times N_A$$

### 3.6 Bestimmung weiterer Serummarker der HBV-Infektion

Die Bestimmung der folgenden Parameter wurde im Rahmen der Routinediagnostik im Zentrallabor und im Institut für Virologie der Charité durchgeführt.

#### 3.6.1 HBV-DNA

Tab. 18 Nachweismethoden der HBV-DNA im Serum<sup>53</sup>.

| Hersteller                            | Methode   | Sensitivität   | Messbereich                                      |
|---------------------------------------|---|--|--|
| Versant HBV-DNA 3.0 (Bayer AG)        | Semiautomatische branched DNA-Signalamplifikation | NWG < 2000 Kopien / ml                                       | 2000-10 <sup>8</sup> Kopien / ml                 |
| Cobas Amplicor HBV Monitor (ROCHE)    | Semiautomatische quantitative RT-PCR              | NWG < 60 IE / ml<br>(1 IE / ml entsprechen 5,26 Kopien / ml) | 60 – 38000 IE / ml<br>(300 – 200000 Kopien / ml) |
| Cobas TaqMan LightCycler 2.0 HBV Test | Quantitative PCR                                  | NWG < 15 IE / ml   | 15 – 100000 IE / ml (79 - 526000 Kopien / ml)    |

#### 3.6.2 Hepatitis-B-Surface-Antigen

Methode: qualitativ ELISA, quantitativ Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) Architect Abbott

Sensitivität: untere NWG  $\leq 0,05$  IU / ml, obere NWG  $\geq 250$  IU / ml, durch Verdünnungen der Seren 1:100 höhere obere NWG  $\geq 25000$  IU / ml.

#### 3.6.3 Hepatitis-B-E-Antigen

Methode: qualitativ ELISA, Architect Abbott

#### 3.6.4 Anti-HBs-Antikörper

Methode: qualitativ ELISA, quantitativ ELISA, Architect Abbott

- Z.n. Impfung gegen HBV: positiv, Immunität bei Titer > 100 IU / l

#### 3.6.5 Anti-HBe-Antikörper

Methode: qualitativer ELISA, Architect Abbott

### **3.6.6 Genotypisierung**

Methode: PCR mit Hybridisierung, Sequenzierung

### **3.6.7 Alanin-Aminotransferase**

Methode: Optimierte Standardmethode IFCC mit Pyridoxalphosphataktivierung

Referenzbereich: Männer: < 50 U / l

Frauen: < 35 U / l

Die Messwerte der Leberenzyme, insbesondere der ALT, wurden auch in Vielfachen des oberen Referenzwertes (ULN) angegeben. Demnach hatte ein Patient mit einer ALT-Konzentration von 100 U / l einen ALT-Wert von 2,0 ULN (Referenzwerte laut IFCC).

### **3.7 Statistische Auswertung**

Die Erfassung der Datensätze und die statistische Analyse erfolgten mit Microsoft Office Excel 2003 und Statistical Products and Service Solutions 18 (SPSS) sowie R Software 2.12.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Folgende Patientenparameter wurden in der Analyse berücksichtigt: Alter, Geschlecht, Konzentrationen der ALT und die virologischen Parameter HBV Genotyp, HBeAg-Status, die Konzentrationen von HBV-DNA, HBsAg, HBV-trRNA und HBV-flRNA jeweils vor Therapie, der Rückgang dieser Parameter während Therapie und die Suppression der Parameter unter die Nachweisgrenzen zu Monat 3 und 6 unter Therapie.

Berechnungen der Testgütekriterien Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte wurden anhand von Vier-Felder-Tafeln durchgeführt.

Parametrische Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Angabe von nicht-parametrischen Werten erfolgte als Median. Signifikanzen (p-Wert) wurden mit two-sided T-Tests, Chi-Quadrat – Test oder Mann-Whitney-U-Test berechnet. Dabei galten p-Werte  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant und p-Werte  $\leq 0,001$  als statistisch hoch signifikant.

Lineare Abhängigkeiten der Parameter wurden mit Pearsons Korrelationskoeffizient (r) untersucht. Fehlende Werte wurden linear interpoliert.

Zur Abschätzung der Faktoren, die mit der HBe-Serokonversion korrelieren, wurde ein multivariates Logit-Modell mit Elastic Net Regularisierung verwendet<sup>54</sup>. Die Performance zur Prädiktion von HBeAg-Serokonversion derjenigen Faktoren, die die höchste Assoziation mit HBeAg-Serokonversion in der multivariaten Analyse gezeigt hatten, wurde mittels ROC-Kurven dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitativer Nachweis von HBV-RNA im Serum

#### 4.1.1 Nachweis von S-Gen-spezifischer RNA

Im ersten Vorversuch sollte vorerst ein qualitativer Nachweis von HBV-RNA im Serum gezeigt werden. Als Probe diente frisches Serum eines Patienten mit chronischer HBV-Infektion und nachweislich hoher HBV-DNA-Konzentration. Das Volumen des Serums wurde geteilt.

Aus einem Teil erfolgte die Präparation der Nukleinsäuren. Anschließend wurde mittels TurboDNase (Abschnitt 3.5.3) die DNA abgebaut. Die unspezifische reverse Transkription erfolgte mit Random Primern wie in Abschnitt 3.5.5.1 beschrieben. HBV-spezifische cDNA wurde mittels einer S-Gen-spezifischen LightCycler-PCR (Abschnitt 3.5.6.1) nachgewiesen. (Die Primer und Sonden werden in der Routinediagnostik zum Nachweis von HBV-DNA eingesetzt.) Es wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser. Außerdem wurde eine RNA-Lösung ohne reverse Transkription nach der Behandlung mit TurboDNase untersucht. In der Analyse der LightCycler-PCR konnten Amplifikate der revers transkribierten HBV-RNA (der cDNA) nachgewiesen werden. Die Cp-Werte als Ausdruck der Amplifikation wurden registriert. In den Reaktionsansätzen der NK und der RNA ohne reverse Transkription zeigten sich keine Amplifikate. Damit konnte ein (unspezifischer) Nachweis von DNA oder RNA ohne Umschreibung ausgeschlossen werden.

In einem zweiten Vorversuch wurde die Stabilität der RNA während der Lagerung bei  $-20\text{ °C}$  geprüft. Dazu wurde ein Teil der frischen Serumprobe mit einem RNase-Inhibitor versetzt und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert, ein anderer Teil wurde ohne Zusätze bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde nach vierwöchiger Lagerung der Probe wiederholt. In der Auswertung der RT-PCR zeigten sich nahezu identische Cp-Werte. Zudem fanden sich keine Unterschiede der Proben mit oder ohne Zusatz eines RNase-Inhibitors. Ein größerer Lagerungsverlust konnte nicht nachgewiesen werden.

#### 4.1.2 Optimierung der RNA-Isolierung

Weitere Vorversuche wurden zur Optimierung der RNA-Isolierung durchgeführt. Die Verbesserung durch Aufreinigungs- und Fällungsschritte sollte evaluiert werden. Als Probe diente weiterhin Serum mit hoher HBV-Viruslast. Nach der Nukleinsäurepräparation wurde das DNA-RNA-Gemisch geteilt. Ein Teil wurde mit TurboDNase behandelt und anschließend mit

## Ergebnisse

RiboPure™-Blood Kit aufgereinigt (Abschnitt 3.5.3). Ein Teil dieser RNA wiederum wurde mit Hilfe von Ethanol gefällt. Nach reverser Transkription der RNAs unspezifisch mit Random Primern (Abschnitt 3.5.5.1) erfolgte die Amplifikation der cDNA mittels S-Gen-spezifischer LightCycler-PCR (Abschnitt 3.5.6.1). Dabei ergaben sich folgende Reaktionsansätze:

Tab. 19 Ergebnisse der LightCycler-PCR der HBV-DNA und HBV-RNA nach Nukleinsäureverdau bzw. nach verschiedenen Aufreinigungsschritten

| <b>Ansatz</b> | <b>Probe</b> | <b>Reaktionsschritte</b>          | <b>Cp-Wert</b> | <b>max. Fluoreszenzwert</b> |
|---------------|--------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 1             | HBV-DNA      |                                   | 23,68          | 5,8                         |
| 2             | NK           |                                   | ∅              | ∅                           |
| 3             | HBV-RNA      |                                   | ∅              | ∅                           |
| 4             | HBV-RNA      | RT                                | 35,50          | 2,4                         |
| 5             | HBV-RNA      | Aufreinigung, RT                  | 36,76          | 2,3                         |
| 6             | HBV-RNA      | Aufreinigung,<br>Fällung, RT      | 35,32          | 5,9                         |
| 7             | HBV-RNA      | Aufreinigung,<br>Fällung, ohne RT | ∅              | ∅                           |
| 8             | NK           | Aufreinigung,<br>Fällung          | ∅              | ∅                           |

In Tabelle 19 sind die Reaktionsansätze und die dazu gehörenden Ergebnisse dargestellt, mithilfe derer gezeigt werden konnte, dass

- a) nach DNase-Verdau keine HBV-DNA-Amplifikation mittels PCR möglich war (Ansatz 1),
- b) der Nachweis von HBV-RNA bzw. HBV-cDNA nur nach reverser Transkription möglich war (Ansätze 3, 7 und 8 vs. 4, 5 und 6) und
- c) die Aufreinigung der HBV-RNA-Ansätze sowie durch Fällung keine Steigerung der Konzentration der HBV-RNA/cDNA erreicht werden konnte (Ansätze 4 - 6).

## **4.2 Quantitativer Nachweis von polyadenylierter HBV-RNA im Serum**

Nach erfolgreichem qualitativem Nachweis von HBV-RNA sollte nun eine PCR zur spezifischen Quantifizierung von HBV-RNA entwickelt werden. Über den Poly(A)-Schwanz kann mRNA mittels oligo(dT)-Primer detektiert werden. Als Grundlage dienten die von Hilger et al. publizierten Primer<sup>14</sup>.

### **4.2.1 Design von Primern und Sonden**

Die Basis für das Design der Primer und Sonden der reversen Transkription und der PCRs für HBV-trRNA sowie für HBV-flRNA bildete ein Alignment der X-Gensequenzen der HBV-Genotypen A bis H. Die Gensequenzen entstammten der GenBank<sup>®55</sup>. Dabei wurden je drei Genome der regional am häufigsten vorkommenden Genotypen A und D, je zwei der Genotypen B, E, F, G und H und ein Genotyp C unter Verwendung des Programms Vector NTI alignt. Das Alignment ist exemplarisch für zwei Genotypen A und C in Abbildung 5 gezeigt. Die Primer- und Sondenbindungsstellen sind unter der entsprechenden Genomsequenz eingezeichnet.

Die Primer für die reverse Transkription wurden aus einer HBV-spezifischen Sequenz (Abbildung 5), einer Oligo(dT)-Sequenz und einer HBV-unspezifischen „Überhang“-Sequenz zusammengesetzt. Der Oligo(dT)-Anteil diente dem spezifischen Nachweis von mRNA durch Bindung an ihren Poly(A)-Schwanz. Die X-Gen-spezifische Sequenz am 3'-Ende des Primers entsprach jeweils einer Sequenz unmittelbar vor der Polyadenylierungsstelle (in 5'-Richtung).

Die sogenannte „Überhang“-Sequenz am 5'-Ende war eine willkürlich gewählte Nukleotidsequenz, die weder im humanen noch im HBV-Genomen vorkam. Zum Ausschluss von Hybridisierungen mit humanen oder anderen viralen Sequenzen wurde die Nukleotidfolge einer Analyse mit dem Programm „BLAST“ (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) unterzogen. Mit Hilfe von BLAST kann man Sequenzen mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenzen vergleichen.

Zur Amplifikation der cDNAs wurde je ein Forward-Primer eingesetzt, dessen Sequenz komplementär zu jener „Überhang“-Sequenz war und ein Reverse-Primer, der je an einer X-Gen-spezifischen Sequenz band (Abbildung 5). Hierdurch können alle bekannten HBV-mRNAs sowie die HBV-pgRNA erfasst werden (Abbildung 2). Bei der Konzipierung der Primer wurde darauf geachtet, dass der Reverse-Primer zur Umschreibung der HBV-flRNA außerhalb der Sequenz der resultierenden HBV-trRNA lag. Demnach wurden Amplifikate von der trcDNA mit einer Länge von 156 bp und von der flcDNA von 154 bp erwartet.

## Ergebnisse

Für die Sequenz der TaqMan-Sonden wurden Nukleotidfolgen gewählt, die innerhalb der zu amplifizierenden HBV-DNA-Sequenz lagen (Abbildung 5). Die Markierung der Sonden erfolgte an einem Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM und am anderen Ende mit dem Quencher BHQ-1.

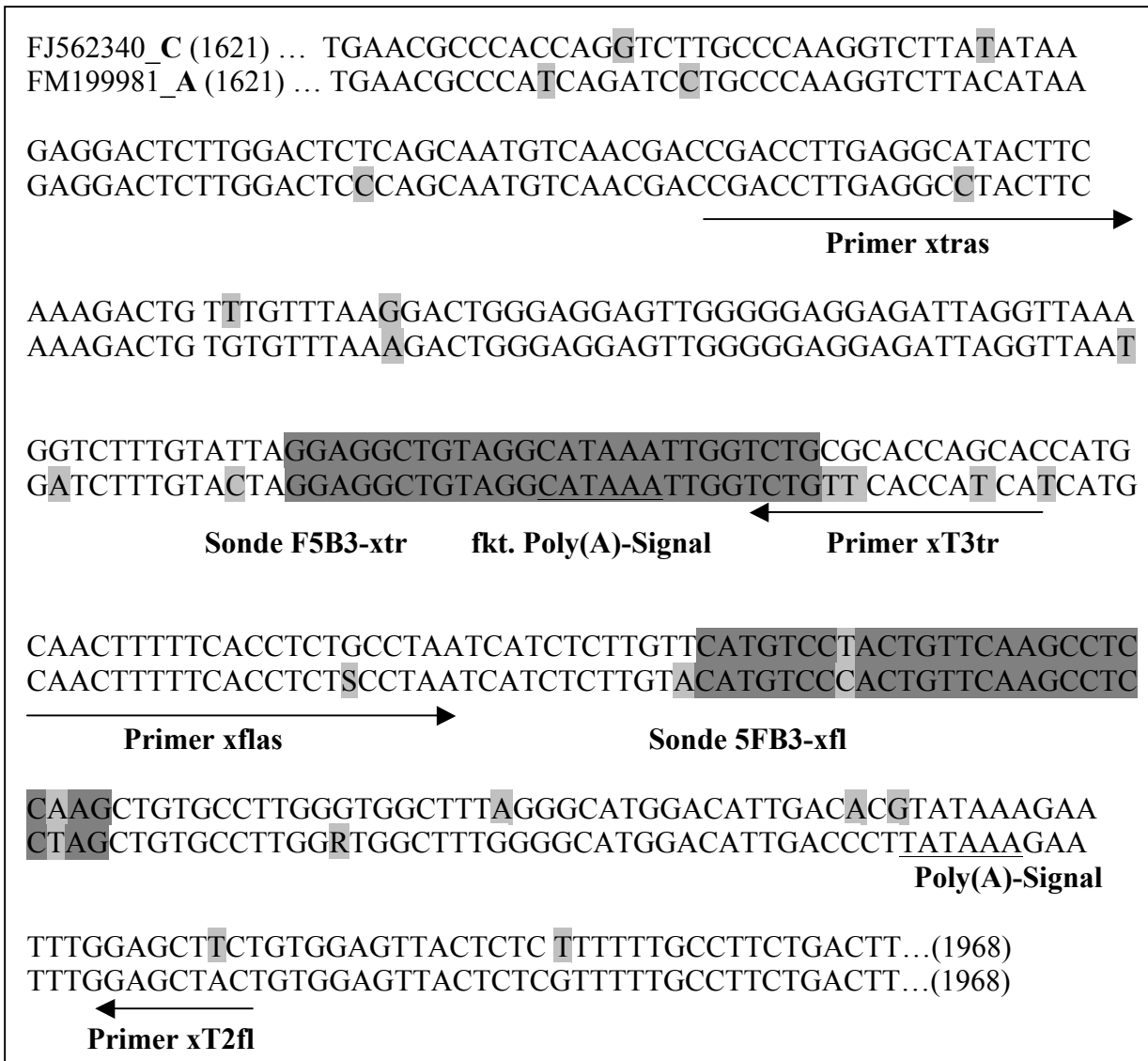


Abb. 5 Auszug aus dem Alignment der HBV-Genome für Genotyp A und C. Die DNA-Sequenzen von 1621 bp bis 1968 bp sind jeweils dargestellt. Die Bindungsstellen der Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die der Sonden sind grau hervorgehoben, die Poly(A)-Signale sind unterstrichen.

Der Ablauf der entwickelten RT-qPCR ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.



## Ergebnisse

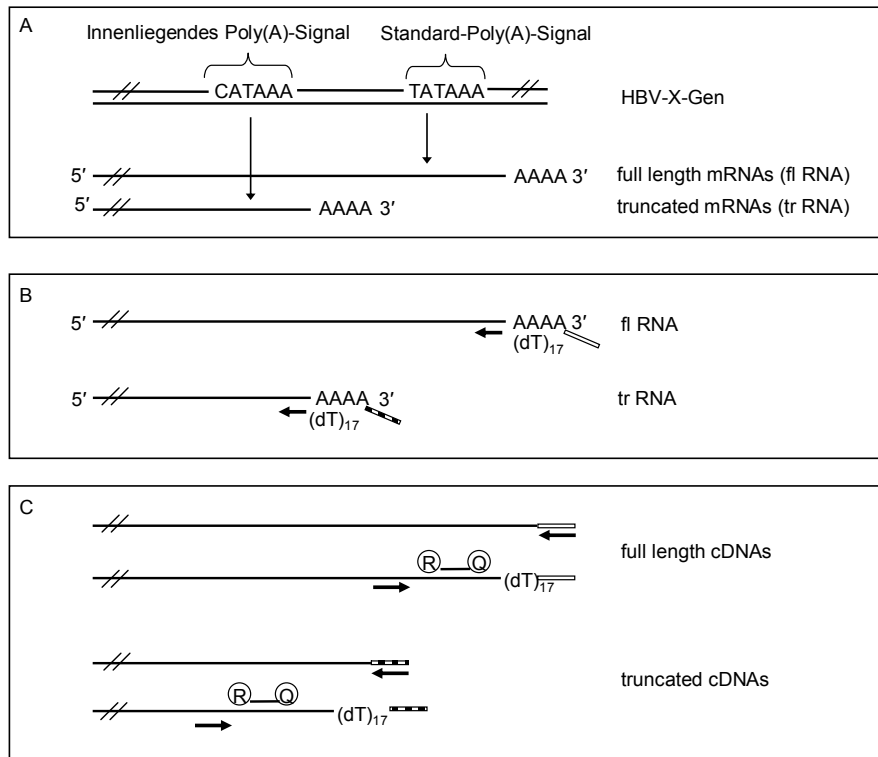


Abb. 6 Schematische Darstellung der RACE-RT-qPCR-Technik, welche zur quantitativen Analyse der HBV-mRNAs genutzt wurde nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>.

**A** Ausschnitt der Transkription des HBV *in vivo*,

**B** Spezifische reverse Transkription der beiden polyadenylierten HBV-RNAs *in vitro* unter Verwendung jeweils eines Primers mit einer am 3'-Ende korrespondierenden Sequenz, gefolgt von oligo(dT) und einer willkürlichen Sequenz und

**C** Amplifikation von cDNA mittels Target-spezifischer RT-qPCR mit Hilfe jeweils eines HBV-X-Gen-spezifischen Primers und einer Fluorophore-markierten TagMan-Sonde in Kombination mit Primern mit der willkürlich erdachten Sequenz. (R = Reporter; Q = Quencher der TaqMan-Sonden)

### 4.2.2 Testung der RT-qPCR

Die konzipierte RT-qPCR sollte überprüft werden. Als Probe diente Serum mit nachweislich hoher HBV-Viruslast. Nach Präparation der Nukleinsäuren erfolgte die reverse Transkription jeweils mit dem Primer PxT2tr sowie dem Primer PxT2fl in getrennten Reaktionsgefäßen wie unter 2.5.5.2 beschrieben. Die PCR erfolgte anschließend mit den Primern Pxtrs und Pxtras bzw. Pxfls und Pxflas im Blockthermocycler (2.5.6.1).

## Ergebnisse

Zum Vergleich wurden in weiteren Reaktionsansätzen die von Hilger et al. beschriebenen Primer zur reversen Transkription und PCR der beiden RNA-Formen eingesetzt<sup>14</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Primer lagen im selben Genomabschnitt wie die von Hilger et al. Beschriebenen; die Sequenzen unterschieden sich minimal. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (Abbildung 7).

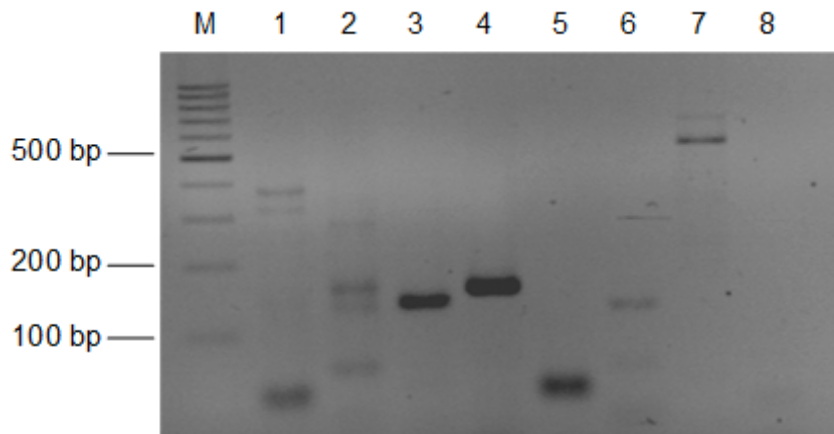


Abb.7 Agarose-Gelelektrophorese mit Produkten der reversen Transkription mit PCR der HBV-trRNA und -flRNA unter Verwendung der Primer von Hilger et al. im Vergleich zu Primern Pxtrs und Pxtras bzw. Pxfls und Pxflas. Die Fragmente in 2%-igen Agarosegel aufgetrennt wurden mit 0,04 ml/l GoldView sichtbar gemacht. Die erwarteten Fragmente für HBV-trRNA bzw. HBV-flRNA lagen bei 156 kp bzw. 154 kb.

Bahn 1: HBV-trRNA im Serum (Primer von Hilger et al.), Bahn 2: HBV-trRNA im Serum (Primer Pxtrs und Pxtras), Bahn 3: HBV-flRNA im Serum (Primer von Hilger et al.), Bahn 4: HBV-flRNA im Serum (Primer Pxfls und Pxflas), Bahn 5: NK (Primer von Hilger et al. für HBV-trRNA), Bahn 6: NK (Primer von Hilger et al. für HBV-flRNA), Bahn 7: NK (Primer Pxtrs und Pxtras), Bahn 8: NK (Primer Pxfls und Pxflas), Bahn M: Längenmarker.

Im Ansatz der flRNA wurde eine Bande bei etwa 150 bp erhalten (Bahn 4). Die Auftrennung des Ansatzes der trcDNA zeigte hingegen mehrere Banden. Die von Hilger et al. beschriebenen Banden wurden nicht bestätigt. Die Spezifität der qualitativen PCR sollte weiter untersucht werden.

### 4.2.3 Spezifität der RT-qPCR

Die analytische Spezifität der entwickelten RT-qPCR-Systeme zum qualitativen Nachweis von HBV-trRNA und -flRNA wurde untersucht. Hierfür wurden Nukleinsäuren aus Serum mit hoher HBV-Viruslast isoliert. Die Umschreibung der RNA erfolgte jeweils mit dem Primer PxT2tr sowie mit dem Primer PxT2fl in getrennten Reaktionsansätzen. Die anschließende PCR wurde mit den Primern Pxtras bzw. Pxflas und den Primern Pxfls bzw. Pxtrs durchgeführt. Parallel erfolgte in weiteren Reaktionsansätzen die PCR des DNA-RNA-Gemisches ohne vorherige RT. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und analysiert (Abbildung 8).

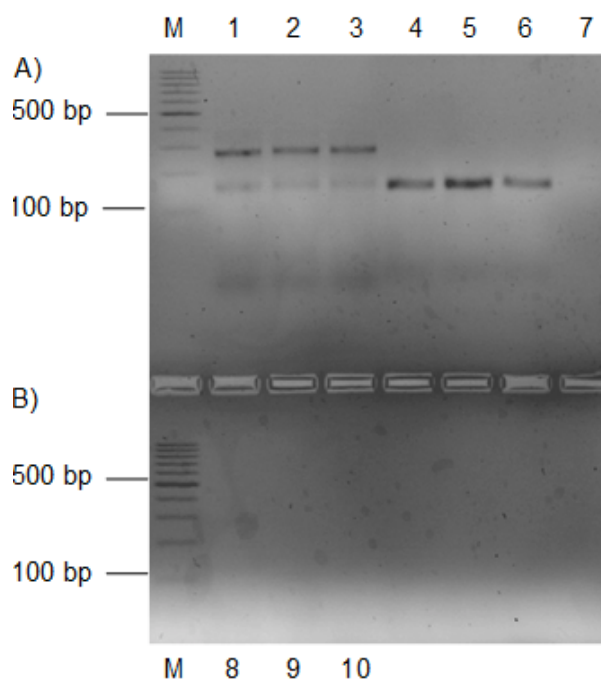


Abb. 8 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der HBV-trRNA bzw. der -flRNA auf der Basis der HBV-cDNA und der HBV-DNA. Die Fragmente in 2%-igen Agarosegel aufgetrennt wurden mit 0,04 ml/l GoldView sichtbar gemacht. Die erwarteten Fragmente für HBV-trRNA bzw. HBV- flRNA lagen bei 156 kp bzw. 154 kb.

Bahn 1 – 3: cDNA-Amplifikate der HBV-trRNA (RT mit PxT2tr, PCR mit Pxtrs und Pxtras),  
 Bahn 4 – 6: cDNA-Amplifikate der HBV-flRNA Amplifikate (RT mit PxT2fl, PCR mit Pxfls und Pxflas ),  
 Bahn 7: Amplifikate der HBV-DNA (keine RT, PCR mit Pxtrs und Pxtras),  
 Bahn 8: Amplifikate der HBV-DNA (keine RT, PCR mit Pxfls und Pxflas),  
 Bahn 9: NK (RT mit PxT2tr, PCR mit Pxtrs und Pxtras) ,  
 Bahn 10: NK (RT mit PxT2fl, PCR mit Pxfls und Pxflas),  
 Bahn M: Längenmarker.

## Ergebnisse

### Ausschluss des Nachweises von HBV-DNA mittels RT-Reaktion und PCR

Die gelelektrophoretischen Auftrennungen der PCR-Produkte des DNA-RNA-Gemisches ohne vorherige RTs zeigten keine Banden. Somit konnten Bindungen der Primer Pxtras bzw. Pxflas und Pxfls bzw. Pxtrs an HBV-DNA und deren Amplifikation während der PCRs ausgeschlossen werden.

### Spezifizierung der Primer

Amplifikate der flcDNA von etwa 150 bp wurden bestätigt (Bahn 4 - 6). Amplifikate der trcDNA wurden, wie erwartet, von etwa 150 bp nachgewiesen. Allerdings zeigte sich eine zusätzliche Bande bei etwa 250 bp (Bahn 1 - 3). Daher wurden die Amplifikate sequenziert.

Zur Analyse dieser Fragmente von etwa 150 bp und 250 bp wurden die Banden aus dem Agarosegel extrahiert (Abschnitt 3.5.2). Die Klonierung der DNA-Moleküle erfolgte mittels TA-Klonierung in Plasmide pSC-A-amp/kan (Abschnitt 3.5.8), welche anschließend mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Mini Präp Kits isoliert und sequenziert wurden (Abschnitt 3.5.11).

Die Sequenzanalyse des 250 bp-Fragments zeigte ein Sequenzfragment des HBV X-Gens und bestätigte somit die Amplifikation der flcDNA durch offensichtlich unspezifische Bindung des Oligo(dT)-Primers PxT2tr an HBV-flRNA. Die Sequenzierungen der 150 bp-Fragmente bestätigten die Amplifikationen der flcDNA und der trcDNA (Sequenzen nicht gezeigt).

Um die Spezifität der Primerbindung des oligo(dT)-Primers PxT2tr zu erhöhen wurde dieser anhand des Alignments (Abbildung 5) in 5'-Richtung vor der Polyadenylierungsstelle um 7 weitere Basen verlängert. Aus 5'-xxx(dT)<sub>17</sub>GDT GGT G-3' wurde 5'-xxx(dT)<sub>17</sub>GDT GGT GMR CAG AC-3', also Primer PxT3tr.

Die Abbildung 9 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der trcDNA nach reverser Transkription mit dem modifizierten Primer PxT3tr.

Es zeigten sich ausschließlich Fragmente von etwa 150 bp bei erwarteter Länge von 156 bp.

## Ergebnisse

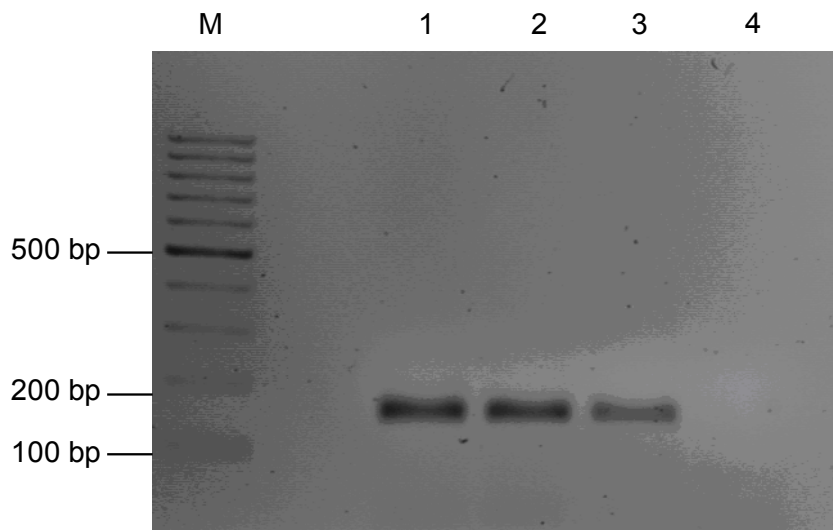


Abb. 9 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der HBV-trRNA bzw. der -flRNA auf der Basis der HBV-cDNA nach RT mit dem modifiziertem Primer PxT3tr (PCR mit Pxtrs und Pxtras) in Bahn 1 – 3, Bahn 4 NK, M Längenmarker. Die Fragmente aufgetrennt in 2%-igem Agarosegel wurden mit 0,04 ml/l GoldView sichtbar gemacht. Die erwarteten Fragmente für HBV-trRNA lagen bei 156 kp. Fragmente der Länge 250 kp waren nicht mehr erkennbar.

Die PCR-Produkte wurden erneut mittels Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die Banden bei etwa 150 bp ausgeschnitten und mittels MinElute Gel Extraction Kit die Nukleinsäuren isoliert. Anschließend erfolgten die Klonierungen wie unter 3.5.8 dargestellt, die Aufreinigungen der Plasmide (Abschnitt 3.5.2) und die Sequenzierungen (Abschnitt 3.5.11).

Die Sequenzanalyse bestätigte die nun ausschließliche Amplifikation der trcDNA nach spezifischer Umschreibung der HBV-trRNA mittels des Primers PxT3tr.

### 4.2.4 Plasmid-basierte Positivkontrollen und Standards

Zur Herstellung der Positivkontrollen und Standardlösungen diente Serum mit hoher HBV-Viruslast.

Nach der Isolierung der Nukleinsäuren mittels High Pure Viral Nucleic Acid Kit erfolgten die Umschreibungen der HBV-RNAs mit dem Primer PxT3tr bzw. dem Primer PxT2fl in getrennten Reaktionsgefäßen. Die PCR erfolgte am Blockthermocycler mit den Primern Pxtrs und Pxtras bzw. mit dem Primern Pxfls und Pxflas (Abschnitt 3.5.6.1).

Die trcDNA und flcDNA wurden in Plasmide einkloniert um deren Stabilität zu erhöhen.

## Ergebnisse

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.5.7) wurden die Banden isoliert, gereinigt und mittels TA-Klonierung kloniert (Abschnitt 3.5.8) und isoliert. Der Restriktionsverdau (Abschnitt 3.5.10) und die Sequenzierungen (Abschnitt 3.5.11) der Plasmide bestätigten die Klonierungen der trcDNA und flcDNA.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Sequenzen der Positivkontrollen trPK und flPK und Abbildung 12 den schematischen Aufbau dieser Plasmide.

```
5'-...CCGACCTTGAGGCCTACTTCAAAGACTGTGTATTTAAAGACTGGGAGGAG  
TTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCCTTGTACTGGGAGGCTGTAGGCATAAAT  
TGGTCTGTTCAACCAGCACCAACAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGTTGTGGAGTCGAG  
CTCA...-3'
```

Abb. 10 Ergebnis der Sequenzierung der trPK. Dargestellt ist ausschließlich der Bereich des Inserts die Primerbindungsstellen sind fett gedruckt und unterstrichen, die Sondenbindungsstelle ist doppelt unterstrichen.

```
5'-...CAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTCATGTCCTACTGTTCAAG  
CCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGA  
ATTTGGAGCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTGAGTAGCGATAGCGTGGT...-3'
```

Abb. 11 Ergebnis der Sequenzierung der flPK. Dargestellt ist ausschließlich der Bereich des Inserts, die Primerbindungsstellen sind fett gedruckt und unterstrichen, die Sondenbindungsstelle ist doppelt unterstrichen.

## Ergebnisse

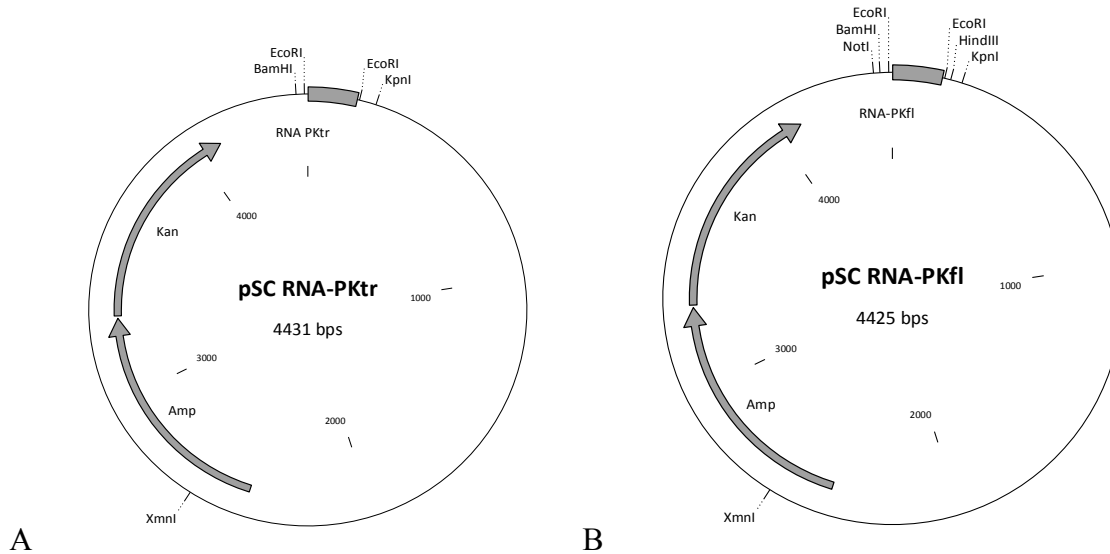


Abb. 12 Plasmidkarten der Positivkontrollen pSC RNA-PKtr (A) und pSC RNA-PKfl (B) nach Klonierung der HBV-trRNA und -flRNA in das Plasmid pSC-A-amp/kan.

### Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der Plasmidlösungen wurden am Spektralphotometer NanoDrop gemessen. Die Konzentration der pSC RNA-PKtr lag bei 211,3 ng /  $\mu$ l (bei 260 nm / 280 nm) und der pSC RNA-PKfl bei 128,9 ng /  $\mu$ l (bei 260 nm / 280 nm).

Die Plasmidkopienzahlen wurden daraus berechnet (Abschnitt 3.5.12).

Die Konzentration der Stammlösung der pSC RNA-PKtr war somit  $4,32 \times 10^{10}$  Kopien /  $\mu$ l und der pSC RNA-PKfl war  $2,64 \times 10^{10}$  Kopien /  $\mu$ l.

### **4.2.5 Plasmid-basierte interne Kontrollen**

Um Fehler der etablierten RT-qPCR zu erkennen, wurden interne Kontrollen (IC) entwickelt, die zum einen die Nukleinsäure-Extraktion kontrollieren und zum anderen die Hemmung der Amplifikation in den Versuchen ausschlossen.

Die Kontrollen sollten bereits während der Nukleinsäurepräparation dem Reaktionsansatz zugefügt werden.

An diese IC wurden folgende Anforderungen gestellt: Sie sollten

- identische Nukleotidsequenzen zur Primerbindung wie HBV-trRNA bzw. -flRNA enthalten,

## Ergebnisse

- je die  $\lambda$ -Sequenz zur Hybridisierung mit der  $\lambda$ -Sonde enthalten, die bei einer Wellenlänge von 705 nm Licht emittiert (Vergleich andere Sonden: 515 nm) um während der Real-time-qPCR(RT-qPCR) diese zu unterscheiden und
- weitere Nukleotidsequenzen aufweisen, die nicht im HBV-Genom oder humanen Genom enthalten waren<sup>57</sup>. Zur Herstellung der internen Kontrollen wurde eine im Plasmid pCR 2.1 TOPO enthaltene  $\lambda$ -Sequenz, je um die Primersequenzen zur Amplifikation der HBV-trRNA bzw. der -flRNA verlängert. Dies erfolgte in folgendem PCR-Ansatz à 50  $\mu$ l nach dem Block-PCR-Protokoll (2.5.6.1):

Tab. 20 50  $\mu$ l-Ansatz der PCR zur Herstellung der IC.

| Reagenz  | Konzentration  | Zusammensetzung |
|--|----------------|-----------------|
| Nuclease-Free Water                            |                | 31,65 $\mu$ l   |
| 10x Puffer II                                  | 1 X            | 5,0 $\mu$ l     |
| dNUTP Mix (je 2,5 mM)                          | 0,200 mM       | 4,0 $\mu$ l     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                      | 2 mM           | 4,0 $\mu$ l     |
| Primer xICtrs/xICfls (10 pmol/ $\mu$ l)        | 0,4 mM         | 2,0 $\mu$ l     |
| oder Primer xICtras/xICflas (10 pmol/ $\mu$ l) | 0,4 mM         | 2,0 $\mu$ l     |
| AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l)                   | 1,25 U         | 0,25 $\mu$ l    |
| Plasmid pCR 2.1 TOPO                           | 0,02 mM (1 ng) | 1,10 $\mu$ l    |
|  |                | 50,0 $\mu$ l    |

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte bestätigte die Generierung von Amplifikaten von jeweils etwa 170 bp. Die theoretische Länge der trIC lag bei 176 bp und die der flIC bei 174 bp.

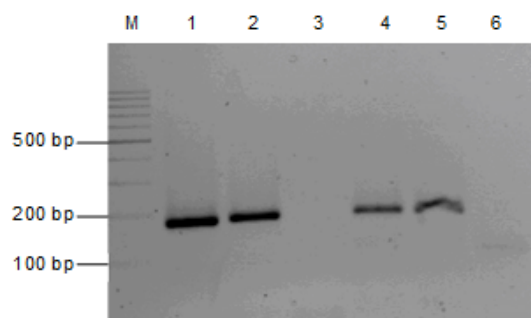


Abb. 13 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Herstellung der internen Kontrollen. Bahn 1 – 2: Amplifikate nach PCR mit Primern PxICtrs und PxICtras (trIC), Bahn 3: NK mit Primern PxICtrs und PxICtras, Bahn 4 - 5: Amplifikate nach PCR mit Primern PxICfls und PxICflas (flIC), Bahn 6: NK mit Primern PxICfls und PxICflas. Die Fragmente wurden in 2%-igem Agarosegel aufgetrennt und mit 0,04 ml / l GoldView sichtbar gemacht.



## Ergebnisse

Spezifische Amplifikate der internen Kontrollen wurden in Plasmid pSC-A amp/kan einkloniert (Abschnitte 3.5.8 - 3.5.10). Es folgten die Sequenzierungen der Plasmide pSC HBV ICtr und pSC HBV ICfl, womit die korrekten Insertionssequenzen der Klonierung bestätigt wurden.

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Ergebnisse der Sequenzierungen und Abbildung 16 die Vektorkarten der Plasmide mit den internen Kontrollen trIC und flIC.

```
5'-...TGGACTCGACTCCACAACCAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAAACAAA  
AACGGGGTTTACCTTACCGAAATCGGTACGGATACCGCGAAAGAGCAGATTTATA  
ACCGCTTCACACTGACGCCGGAAGGGGATGAACCGCTAGCAGTGGCGCCCGAAC  
GAAGTAGGCCTCAAGGTCGG...-3'
```

Abb. 14 Ergebnis der Sequenzierung der trIC nach erfolgreicher Klonierung. Dargestellt ist ausschließlich der Bereich des Inserts, die Primerbindungsstellen sind fett gedruckt und der Anteil der PCR-Primerbindung ist zusätzlich unterstrichen, die Sondenbindungsstelle ist doppelt unterstrichen.

```
5'-...ACCACGCTATCGCTACTCACAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAAACAAA  
ACGGGGTTTACCTTACCGAAATCGGTACGGATACCGCGAAAGAGCAGATTTATAAC  
CGCTTCACACTGACGCCGAGGGGGATGAACCGCTAGCAGTGGCGCCCGAACTA  
GGCAGAGGTGAAAAAG...-3'
```

Abb. 15 Ergebnis der Sequenzierung der flIC nach erfolgreicher Klonierung. Dargestellt ist ausschließlich der Bereich des Inserts, die Primerbindungsstellen sind fett gedruckt und der Anteil der PCR-Primerbindung ist zusätzlich unterstrichen, die Sondenbindungsstelle ist doppelt unterstrichen.

## Ergebnisse

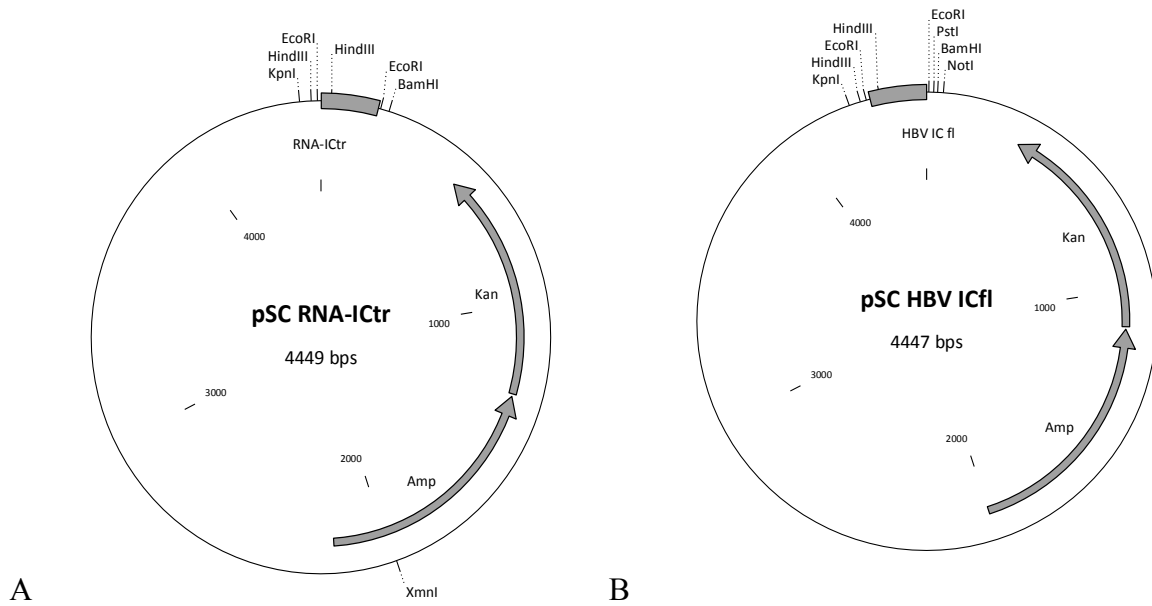


Abb. 16 Vektorkarten der Plasmide pSC RNA-ICtr (A) und pSC RNA-ICfl (B).

### **Analytische Spezifität und Sensitivität der internen Kontrollen:**

Zur Überprüfung der analytischen Spezifität wurden in PCR-Ansätzen die ICs mit den Sonden F5B3-xtr bzw. F5B3-xfl oder der  $\lambda$  IC-Sonde kombiniert.

Mit dem Ziel der optimalen IC-Konzentration im Reaktionsansatz wurden Ansätze hergestellt, die die Positivkontrollen, die internen Kontrollen, je die Sonde F5B3-xtr bzw. F5B3-xfl und die  $\lambda$  IC-Sonde enthielten. Die Konzentration der IC wurde variiert.

## Ergebnisse

Tab. 21 Ermittlung der optimalen trIC-Konzentration im PCR-Ansatz. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm und bei 705 nm.

| <b>Probe<br/>(Konzentration)</b>                | <b>Sonde<br/>(Konzentration)</b>       | <b>Fmax bei<br/>525 nm</b> | <b>Cp-Wert bei<br/>525 nm</b> | <b>Fmax bei<br/>705 nm</b> | <b>Cp-Wert bei<br/>705 nm</b> |
|---|--|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| trPK<br>(19 Kopien/ $\mu$ l)                    | F5B3-xtr<br>(300 nM)                   | 0,64                       | 33,75                         | 0                          | 0                             |
| trPK<br>(19 Kopien / $\mu$ l)                   | $\lambda$ IC-Sonde<br>(300 nM)         | 0                          | 0                             | 0                          | 0                             |
| trIC<br>(100 Kopien / $\mu$ l)                  | F5B3-xtr<br>(300 nM)                   | 0                          | 0                             | 0                          | 0                             |
| t IC<br>(100 Kopien / $\mu$ l)                  | $\lambda$ IC-Sonde<br>(300 nM)         | 0                          | 0                             | 1,30                       | 34,0                          |
| trPK (19K./ $\mu$ l) +<br>trIC (50K./ $\mu$ l)  | F5B3-xtr + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,93                       | 33,13                         | 1,50                       | 33,92                         |
| trPK (19K./ $\mu$ l) +<br>trIC (100K./ $\mu$ l) | F5B3-xtr + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,92                       | 32,79                         | 1,76                       | 33,17                         |
| trPK (19K./ $\mu$ l) +<br>trIC (200K./ $\mu$ l) | F5B3-xtr + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,78                       | 32,78                         | 1,75                       | 32,61                         |
| trPK (19K./ $\mu$ l) +<br>trIC (400K./ $\mu$ l) | F5B3-xtr + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,64                       | 32,33                         | 1,70                       | 31,98                         |

trPK = pSC RNA-PKtr, trIC = pSC RNA-ICtr, Fmax = maximale Fluoreszenz.

Tab. 22 Ermittlung der optimalen flIC-Konzentration im PCR-Ansatz. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm und bei 705 nm.

| <b>Probe<br/>(Konzentration)</b>                 | <b>Sonde<br/>(Konzentration)</b>       | <b>Fmax bei<br/>525 nm</b> | <b>Cp-Wert bei<br/>525 nm</b> | <b>Fmax bei<br/>705 nm</b> | <b>Cp-Wert bei<br/>705 nm</b> |
|--|--|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| flPK<br>(29 Kopien/ $\mu$ l)                     | F5B3-xfl<br>(300 nM)                   | 0,75                       | 34,63                         | 0                          | 0                             |
| flPK<br>(29 Kopien / $\mu$ l)                    | $\lambda$ IC-Sonde<br>(300 nM)         | 0                          | 0                             | 0                          | 0                             |
| flIC<br>(100 Kopien / $\mu$ l)                   | F5B3-xfl<br>(300 nM)                   | 0                          | 0                             | 0                          | 0                             |
| f IC<br>(100 Kopien / $\mu$ l)                   | $\lambda$ IC-Sonde<br>(300 nM)         | 0                          | 0                             | 0,54                       | 34,91                         |
| flPK (29K./ $\mu$ l) +<br>flIC (50 K./ $\mu$ l)  | F5B3-xfl + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,92                       | 33,99                         | 0,72                       | 34,47                         |
| flPK (29K./ $\mu$ l) +<br>flIC (100 K./ $\mu$ l) | F5B3-xfl + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 1,03                       | 33,88                         | 0,85                       | 33,64                         |
| flPK (29K./ $\mu$ l) +<br>flIC (200 K./ $\mu$ l) | F5B3-xfl + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,92                       | 33,81                         | 0,87                       | 33,21                         |
| flPK (29K./ $\mu$ l) +<br>flIC (400 K./ $\mu$ l) | F5B3-xfl + $\lambda$ IC<br>(je 150 nM) | 0,72                       | 33,93                         | 0,87                       | 32,55                         |

flPK = pSC RNA-PKfl, flIC = pSC RNA-ICfl, Fmax = maximale Fluoreszenz.

## Ergebnisse

Sowohl die PCR-Ansätze, die die Positivkontrolle tr/fl und die  $\lambda$ -Sonde enthielten, als auch die Ansätze mit der internen Kontrolle tr/fl und der PCR-Sonde tr/fl zeigten weder bei 525 nm noch bei 705 nm ein Signal.

Die Hybridisierung der Sonden F5B3-xtr und F5B3-xfl mit den IC einerseits und andererseits der  $\lambda$ -Sonde mit HBV-trRNA und -flRNA konnte ausgeschlossen werden.

In der Auswertung bei 705 nm konnten für die Ansätze, die jeweils nur die internen Kontrollen und die  $\lambda$ -Sonde enthielten, gute Fluoreszenzen gemessen werden. Die Detektion der jeweiligen internen Kontrolle durch die  $\lambda$ -Sonde war spezifisch.

Konzentrationen der ICs von je 50 Kopien je Ansatz lieferten sehr geringe Fluoreszenzsignale, sodass die Kurvenverläufe sehr flach waren.

Bei allen späteren Messungen waren 100 Kopien der trIC bzw. 100 Kopien der flIC pro PCR-Ansatz enthalten.

### 4.2.6 Optimierung der PCR-Ansätze und -Bedingungen

#### 4.2.6.1 Primermatrix

Unterschiedliche Primerkonzentrationen in den PCRs wurden kombiniert um die optimalen Konzentrationen zur Verhinderung von Primer-Dimer-Bildungen zu verhindern. Dazu wurde jeweils eine Primermatrix angefertigt. Dabei variierten die Primerkonzentrationen der Forward- und Reversprimer jeweils im Bereich von 100nM bis 900nM bei konstanten Sondenkonzentrationen und PCR-Bedingungen (Tabellen 23 und 24).

Tab. 23 Ergebnisse der RT-qPCR der Primermatrix der Primer Pxtrs und Pxtras zum Nachweis der HBV-trRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von Pxtrs | Konzentration von Pxtras | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|-------------------------|--------------------------|---------|-----------------|
| 100 nM                  | 100 nM                   | 28,80   | 0,60            |
| 100 nM                  | 300 nM                   | 29,28   | 0,84            |
| 100 nM                  | 900 nM                   | 29,54   | 0,90            |
| 300 nM                  | 100 nM                   | 29,06   | 0,68            |
| 300 nM                  | 300 nM                   | 29,65   | 0,83            |
| 300 nM                  | 900 nM                   | 28,99   | 0,84            |
| 900 nM                  | 100 nM                   | 28,84   | 0,68            |
| 900 nM                  | 300 nM                   | 29,24   | 0,84            |
| 900 nM                  | 900 nM                   | 28,30   | 0,85            |
| NK                      |                          | 0       | 0               |

## Ergebnisse

Tab. 24 Ergebnisse der RT-qPCR der Primermatrix der Primer Pxfls und Pxflas zum Nachweis der HBV-fIRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von Pxfls | Konzentration von Pxflas | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|-------------------------|--------------------------|---------|-----------------|
| 100 nM                  | 100 nM                   | 33,70   | 0,65            |
| 100 nM                  | 300 nM                   | 31,30   | 1,25            |
| 100 nM                  | 900 nM                   | 31,72   | 1,24            |
| 300 nM                  | 100 nM                   | 30,85   | 1,24            |
| 300 nM                  | 300 nM                   | 31,03   | 1,33            |
| 300 nM                  | 900 nM                   | 30,75   | 1,35            |
| 900 nM                  | 100 nM                   | 30,68   | 1,38            |
| 900 nM                  | 300 nM                   | 30,52   | 1,42            |
| 900 nM                  | 900 nM                   | 30,91   | 1,40            |
| NK                      |                          | 0       | 0               |

In der Auswertung der RT-qPCR zeigten sich die höchsten Fluoreszenzsignale bei Primerkonzentrationen von  $[Pxtrs] = 300 \text{ nM}$  und  $[Pxtras] = 900 \text{ nM}$ , sodass diese Konzentrationen ins Standardprotokoll aufgenommen wurden.

Die Variierung der Primerkonzentrationen Pxfls und Pxflas führte zu keiner wesentlichen Änderung der Cp-Werte oder maximalen Fluoreszenz, sodass eine Primerkonzentration von 500 nM für das Standardprotokoll der PCR der HBV-fIRNA gewählt wurde.

### 4.2.6.2 Optimierung der Sondenkonzentrationen

Die Sondenkonzentrationen wurden in den RT-qPCR -Ansätzen im Bereich von 150 nM bis 350 nM bei konstanten Primerkonzentrationen und PCR-Bedingungen variiert (Tabellen 25 und 26). In einem Vorversuch wurden verschiedene Ansätze ohne  $\lambda$ -Sonde mit Konzentrationen der Sonden F5B3-xtr und F5B3-xfl von 150 nm bis 350 nm hergestellt (Tabelle 27).

Tab. 25 Ergebnisse der RT-qPCR zur Optimierung der Konzentration der Sonde F5B3-xtr zum Nachweis der HBV-trRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von F5B3-xtr | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|----------------------------|---------|-----------------|
| 150 nM                     | 27,82   | 0,75            |
| 200 nM                     | 28,03   | 0,78            |
| 250 nM                     | 27,26   | 0,78            |
| 300 nM                     | 28,35   | 0,78            |
| 350 nM                     | 28,33   | 0,72            |
| NK                         | 0       | 0               |

## Ergebnisse

Tab. 26 Ergebnisse der RT-qPCR zur Optimierung der Konzentration der Sonde F5B3-xfl zum Nachweis der HBV-flRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von F5B3-xfl | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|----------------------------|---------|-----------------|
| 150 nM                     | 31,31   | 1,18            |
| 200 nM                     | 30,92   | 1,18            |
| 250 nM                     | 31,61   | 1,13            |
| 300 nM                     | 31,61   | 1,05            |
| 350 nM                     | 31,64   | 1,03            |
| NK                         | 0       | 0               |

Daraufhin wurden PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen der Sonden F5B3-xtr bzw. F5B3-xfl von 150 nM und 200 nM und Konzentrationen der  $\lambda$ -Sonde von 150 nM und 200 nM hergestellt.

Tab. 27 Ergebnisse der RT-qPCR zur Optimierung der Konzentration der Sonden F5B3-xtr und der  $\lambda$ -Sonde zum Nachweis der HBV-trRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von F5B3-xtr | Konzentration der $\lambda$ -Sonde | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|----------------------------|------------------------------------|---------|-----------------|
| 150 nM                     | 150 nM                             | 34,76   | 0,58            |
| 200 nM                     | 150 nM                             | 33,93   | 0,63            |
| 150 nM                     | 200 nM                             | 34,26   | 0,61            |
| 200 nM                     | 200 nM                             | 34,14   | 0,38            |
| NK                         |                                    | 0       | 0               |

Tab. 28 Ergebnisse der RT-qPCR zur Optimierung der Konzentration der Sonden F5B3-xfl und der  $\lambda$ -Sonde zum Nachweis der HBV-flRNA. Die Auswertung erfolgte bei 525 nm.

| Konzentration von F5B3-xfl | Konzentration der $\lambda$ -Sonde | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|----------------------------|------------------------------------|---------|-----------------|
| 150 nM                     | 150 nM                             | 34,32   | 0,46            |
| 200 nM                     | 150 nM                             | 33,33   | 0,24            |
| 150 nM                     | 200 nM                             | 34,65   | 0,35            |
| 200 nM                     | 200 nM                             | 33,67   | 0,32            |
| NK                         |                                    | 0       | 0               |

In der Auswertung der RT-qPCR zeigten sich die besten Kurvenverläufe mit maximaler Fluoreszenz für die HBV-trRNA bei Konzentrationen von [F5B3-xtr] = 200 nm und [ $\lambda$ -Sonde] = 150 nm und für die HBV-flRNA bei Konzentrationen von [F5B3-xfl] = 150 nm und [ $\lambda$  - Sonde] = 150 nm, welche in das Standardprotokoll übernommen wurden.

#### 4.2.6.3 Optimierung des PCR-Protokolls

Veränderungen der PCR-Reaktionszeiten wie Verlängerung der Aktivierungszeit von 10 min auf 15 min und Verlängerung der Denaturierungszeit je PCR-Zyklus von 5 sec auf 10 sec bei jeweils konstanten PCR-Ansätzen und Temperaturen führten zu keiner Verbesserung der PCR-Ergebnisse. Dementsprechend wurde für die folgenden Messungen ein Standardprotokoll, wie unter 3.5.6.1 angegeben, erstellt.

#### 4.2.7 Etabliertes Standardprotokoll zur Amplifikation von polyadenylierter HBV-RNA im Serum

Als Ergebnis der Optimierungen der PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen resultierte folgendes Protokoll zur Quantifizierung von HBV-trRNA und fRNA aus Patientenseren (Tabelle 29):

Tab. 29 RT-qPCR -Ansätze zum Nachweis der HBV-trRNA und -fRNA. Standardprotokolle in 20 µl-Ansätzen.

|                       | Konzentration            | Zusammensetzung für HBV-trRNA | Zusammensetzung für HBV-fRNA |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Sonde F5B3-xtr (5 µM) | 200 nM                   | 0,8 µl                        |                              |
| Sonde F5B3-xfl (5 µM) | 150 nM                   |                               | 0,6 µl                       |
| λ-Sonde (5 µM)        | 150 nM                   | 0,6 µl                        | 0,6 µl                       |
| Primer xtrs (5 µM)    | 300 nM                   | 1,2 µl                        |                              |
| Primer xtras (5 µM)   | 900 nM                   | 3,6 µl                        |                              |
| Primer xfls (10µM)    | 500 nM                   |                               | 1,0 µl                       |
| Primer xflas (10 µM)  | 500 nM                   |                               | 1,0 µl                       |
| Polymerase-Mix        | 3,5 mM MgCl <sub>2</sub> | 4,0 µl                        | 4,0 µl                       |
| Nuclease-free Water   |                          | 7,8 µl                        | 10,8 µl                      |
| HBV-RNA               |                          | 2,0 µl                        | 2,0 µl                       |
|                       |                          | 20,0 µl                       | 20,0 µl                      |

#### 4.2.8 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenzen) der RT-qPCR

Zur Bestimmung der Detektionsgrenzen der HBV-trRNA und -fRNA wurden Verdünnungen der Plasmidlösungen PK tr und PK fl angefertigt und nach dem Standard-PCR-Protokoll (Abschnitt 4.2.7) in 24 Parallelreaktionen amplifiziert. Die untere Detektionsgrenze war definiert als Konzentration der HBV-RNA, die in 95% der Experimente noch amplifizierbar ist. Die Versuche wurden wiederholt durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 30 und 31 und in den Abbildungen 17 und 18 gezeigt.

## Ergebnisse

Die unteren Detektionsgrenzen lagen für die HBV-trRNA bei < 600 Kopien / ml und für die HBV-flRNA bei < 450 Kopien / ml (Tabellen 30 und 31). HBV-trRNA-Konzentrationen von 300 Kopien / ml konnten mittels der RT-qPCR amplifiziert werden (Tabelle 30), allerdings zeigte sich in der Auswertung kein idealer S-förmiger Kurvenverlauf (Abbildung 17, Fluoreszenz gegen Zyklusnummer, rosafarbene und schwarze Kurven) für diese Konzentration, sodass eine Quantifizierung nicht exakt möglich war.

Analog verliefen die Kurven der HBV-flRNA der Konzentrationen 225 Kopien / ml nicht S-förmig (Abbildung 18, Fluoreszenz gegen Zyklusnummer, mittel- und dunkelblaue Kurven), sodass diese Konzentration nicht exakt quantifizierbar war.

Gemessene Konzentrationen der HBV-RNAs (messbarer Cp-Wert und messbare Fluoreszenz) unterhalb der definierten Nachweisgrenzen wurden in den folgenden Messungen als „positiv“ bezeichnet.

Tab. 30 Ergebnisse der RT-qPCR zur Bestimmung der unteren Detektionsgrenze der HBV-trRNA, Auswertung bei 525 nm.

| Konzentration von HBV-trRNA in Kopien/ml Serum | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|--|---------|-----------------|
| 4800   | 33,85   | 0,67            |
| 1200   | 35,32   | 0,46            |
| 600  | 36,11   | 0,13            |
| 300  | 36,59   | 0,12            |
| 150  | 0       | 0               |
| NK   | 0       | 0               |

Tab. 31 Ergebnisse der RT-qPCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze der HBV-fl-RNA, Auswertung bei 525 nm.

| Konzentration von HBV-flRNA in Kopien/ml Serum | Cp-Wert | Fmax bei 525 nm |
|--|---------|-----------------|
| 3625   | 35,02   | 0,58            |
| 1800   | 36,03   | 0,60            |
| 900  | 36,59   | 0,42            |
| 450  | 36,90   | 0,23            |
| 225  | 37,96   | 0,15            |
| NK   | 0       | 0               |



## Ergebnisse

File: C:\LightCycler33\Users\user1\Data\Anne\20091015\_Nachweisgrenze2.ABT Program: Amplif Run By: user1  
Run Date: Oct 15, 2009 13:38 Print Date: 15 October, 2009

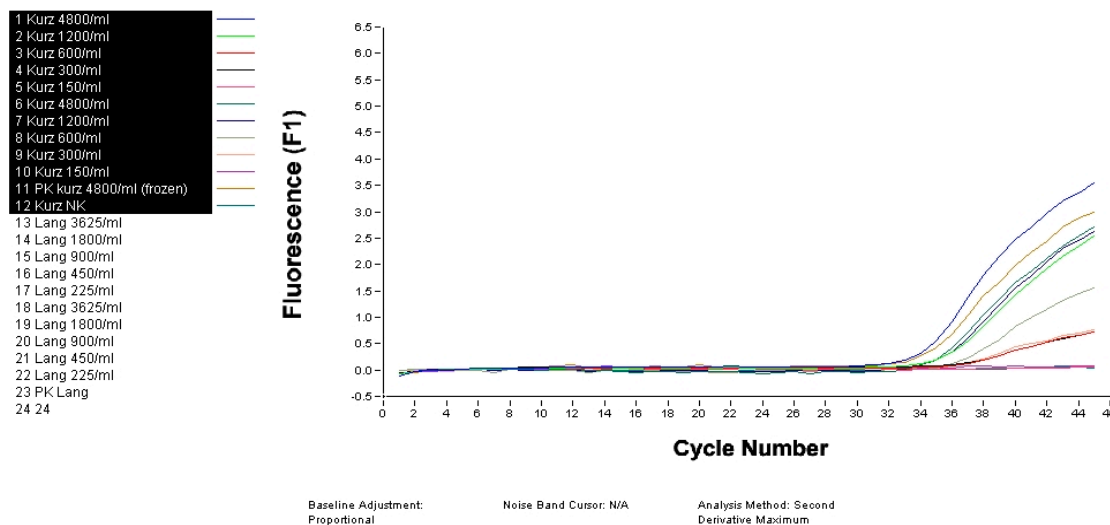


Abb. 17 RT-qPCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze der HBV-trRNA, Auswertung bei 525 nm. Samples 1 - 10 stellen Plasmidlösungen mit HBV-trRNA in unterschiedlichen Konzentrationen dar, Sample 11 ist der mitgeführte Standard (4800 Kopien / ml Serum) und Sample 12 die Negativkontrolle. Nachweisgrenze für Quantifizierung der HBV-trRNA bei < 600 Kopien / ml.

File: C:\LightCycler33\Users\user1\Data\Anne\20091015\_Nachweisgrenze2.ABT Program: Amplif Run By: user1  
Run Date: Oct 15, 2009 13:38 Print Date: 15 October, 2009

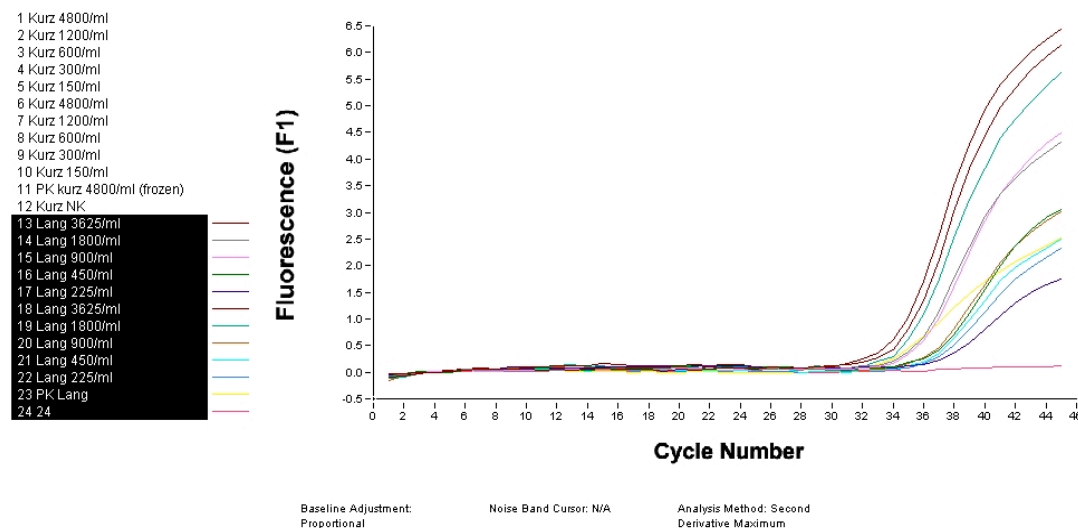


Abb. 18 RT-qPCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze der HBV-flRNA, Auswertung bei 525 nm. Samples 13 - 22 stellen Plasmidlösungen mit HBV-flRNA in unterschiedlichen Konzentrationen dar, Sample 23 ist der mitgeführte Standard (3600 Kopien / ml Serum) und Sample 24 die Negativkontrolle. Nachweisgrenze für Quantifizierung der HBV-flRNA bei < 450 Kopien / ml.

#### 4.2.9 Bestimmung des linearen Messbereichs

##### Erstellen von Eichgeraden

Die Standardkurve gibt somit den linearen Zusammenhang der Cp-Werte und dekadischen Logarithmus der Konzentrationen der Standardlösungen wieder. Durch die verschiedenen Verdünnungen der Standards kann eine Eichgerade erstellt werden.

Die Eichgerade ist gemäß der Geradengleichung  $y = f(x) = m \cdot x + n$  durch den Anstieg ( $m = \text{„Slope“}$ ) und dem Schnittpunkt mit der y-Achse ( $n = \text{„Intercept“}$ ) beschrieben.

Mit Hilfe des Anstiegs kann die Effizienz (E) der RT-qPCR mit folgender Formel berechnet werden:  $E = 10^{-1/m} - 1$ .

Bei einem Anstieg von  $m = -2,824$  ergibt sich eine Effizienz der RT-qPCR zur Messung der HBV-trRNA von  $E = 1,214$  und damit von mehr als 100%, d.h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus. Die Fehlerrate wurde mit 0,098 angegeben.

Die RT-qPCR zur Amplifikation der umgeschriebenen HBV-flRNA erreicht bei einem Anstieg von  $m = -2,937$  eine Effizienz von  $E = 1,19$  und eine Fehlerrate von 0,365.

Von den Standardlösungen der trPK und der flPK wurden 10er-Verdünnungsreihen angefertigt und die RT-PCR nach dem Standardprotokoll durchgeführt (Abschnitt 4.2.7).

Der lineare Messbereich (95%) der HBV-trRNA wurde ermittelt von 600 Kopien / ml bis  $10^6$  Kopien / mL und analog der HBV-flRNA von 450 Kopien / ml bis  $10^6$  Kopien / mL.

# Ergebnisse

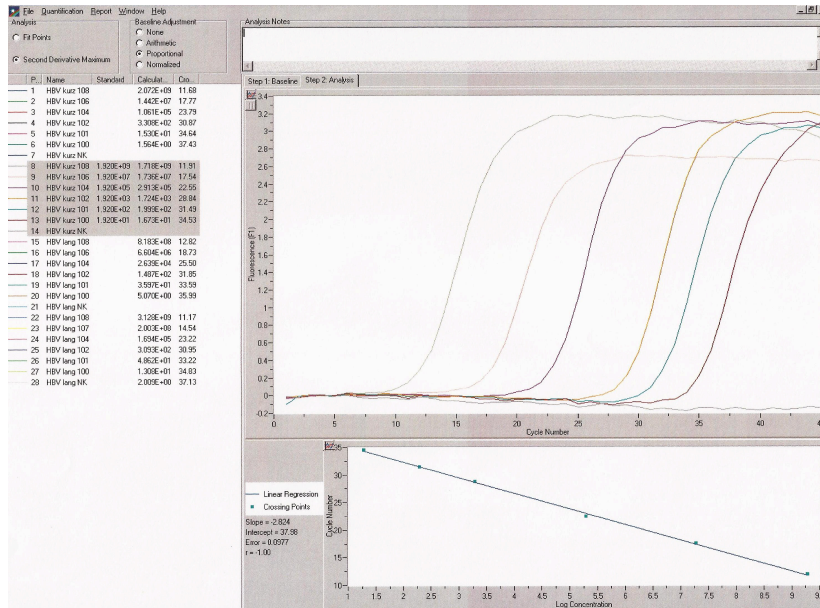


Abb. 19 Eichgerade für HBV-trRNA-spezifische RT-qPCR am LightCycler 1.5  
 Sample 8 - 13 Ansätze verschiedener Konzentrationen der trPK, Sample 14 NK. Die obere Abbildung zeigt die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zykluszahl dargestellt, das untere Bild zeigt die Standardkurve der Zykluszahl in Abhängigkeit der logarithmierten Konzentration der HBV-trRNA.

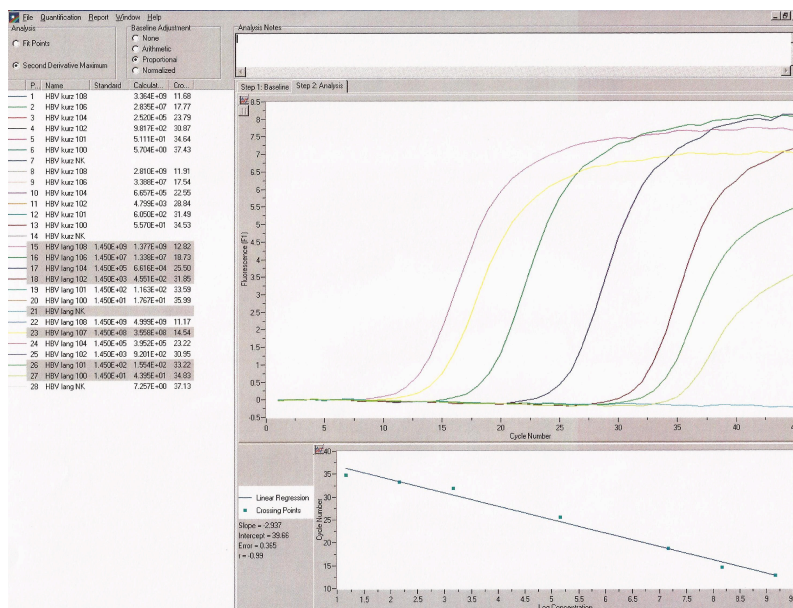


Abb. 20 Eichgerade für HBV-fIRNA-spezifische RT-qPCR am LightCycler 1.5  
 Sample 15 - 18, 23, 26 - 27 Ansätze verschiedener Konzentrationen der fIPK, Sample 21 NK. Die obere Abbildung zeigt die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zykluszahl dargestellt, das untere Bild zeigt die Standardkurve der Zykluszahl in Abhängigkeit der logarithmierten Konzentration der HBV-fIRNA.

### **4.3 Charakterisierung des Patientenkollektivs**

#### **4.3.1 Auswahl der Patienten und Herkunft der Seren**

Mit der etablierten Methode zur Quantifizierung der HBV-RNA im Serum sollten im Folgenden Konzentrationen der HBV-RNA bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion vor und während antiviraler Therapie untersucht werden.

Es wurde ein Kollektiv von Patienten gewählt, die eine Therapie mit Tenofovir (245 mg / Tag) erhielten und die sich im Rahmen der Lebersprechstunde der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum behandeln ließen. Die analysierten Seren entstammten der Serumbank der genannten Klinik. Patienten hatten zuvor ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Auswahl der Seren erfolgte nach u.g. Kriterien.

Um die Anzahl der Patienten sekundär zu erhöhen, wurden auch Patienten mit antiviraler Therapie durch Lamivudin (100 mg / Tag) retrospektiv in die Analyse eingeschlossen.

Bevorzugt wurden HBeAg-positive Patienten mit nachweislicher HBeAg-Serokonversion im Verlauf ausgewählt. Entsprechend der Charakteristika Alter, Geschlecht, Genotyp und Viruslast vor Therapiebeginn wurden diese Patienten anderen Patienten ohne nachweisliche HBeAg-Serokonversion zugeordnet.

#### **3.3.1.1 Einschlusskriterien der Patienten mit chronischer HBV-Infektion**

- Vorliegen einer chronischen Hepatitis B
- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Therapie mit Tenofovir (245 mg / Tag) oder Lamivudin (100 mg / Tag)
- Vorhandensein von Serum gelagert bei -20 °C vor Therapiebeginn und im Verlauf von 3, 6, 9, 12 und mehr Monaten

#### **3.3.1.2 Ausschlusskriterien der Patienten mit chronischer HBV-Infektion**

- Kombinationstherapie aus mehreren Nukleos(t)id-Analoga bzw. mit Interferon-alpha
- Keine ausreichende Anzahl an Serumproben vor Therapiebeginn und im Verlauf verfügbar
- Leberzirrhose oder hepatozelluläres Karzinom

Insgesamt wurden unter Beachtung der Ein- und Ausschlusskriterien sequentielle Seren von insgesamt 79 Patienten mit HBV-Infektion, die zwischen 1998 - 2010 behandelt wurden, analysiert.

## Ergebnisse

Diese Seren wurden nach der Entnahme eingefroren und bis zur Messung der RNA-Konzentrationen im Mittel 40 Monate (Standardabweichung  $\sigma_x = 26$  m; Spannweite  $R = 98$  m) bei  $-20$  °C gelagert.

Tab. 32 Charakteristik des untersuchten Patientenkollektivs mit chronischer HBV-Infektion. n.b. nicht bestimmt

| Anzahl der Patienten        |         | Therapie mit   |                |
|-----------------------------|---------|----------------|----------------|
|                             |         | TDF 245 mg / d | LAM 100 mg / d |
| insgesamt                   |         | 48             | 31             |
| Alter (Median) in Jahren    |         | 47             | 39             |
| Geschlecht                  | Männer  | 39             | 21             |
|                             | Frauen  | 9              | 10             |
| HBV-Genotyp                 | A       | 13             | 9              |
|                             | B       | 2              | 1              |
|                             | C       | 4              | 6              |
|                             | D       | 28             | 15             |
|                             | E       | 1              | 0              |
| HBeAg vor Therapiebeginn    | positiv | 38             | 28             |
|                             | negativ | 10             | 3              |
| HBeAg-Serokonversion        |         | 7              | 12             |
| HBsAg-Serokonversion        |         | 0              | 2              |
| Nachgewiesene LAM-Resistenz |         | 5              | 14             |

### 4.3.2 Weitere Charakteristika der Patienten

Charakteristika wie Alter, Geschlecht, Nationalität, Komorbiditäten, Lebererkrankungen und Vortherapien sowie HBV-Genotyp, HBeAg-Status vor Therapiebeginn und eine (im Beobachtungszeitraum) nachweisbare HBeAg- und HBsAg-Serokonversion wurden nach Einwilligung der Patienten freundlicherweise von der Lebersprechstunde der Hepatologie der Charité, Campus Virchow zur Verfügung gestellt bzw. aus bereits bestehenden Datensätzen aufgenommen.

### 4.3.3 Patientenkollektiv für die Berechnungen der Kinetik der Parameter unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga

Für die Berechnungen der Kinetik wurden aus dem ursprünglichen Kollektiv weitere Patienten ausgeschlossen:

## Ergebnisse

Die Patienten mussten ein ähnliches virales Ansprechen wie die Patienten, die mit TDF behandelt wurden, zeigten d.h. die Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze von 400 Kopien / ml innerhalb von 24-monatiger Behandlung. Patienten, bei denen ein Verdacht auf Lamivudin-Resistenz bestand (Wiederanstieg der HBV-DNA unter Therapie), wurden ausgeschlossen.

Die Berechnungen der Kinetik der HBV-RNA im Vergleich zur anderen Parametern wie HBV-DNA und HBsAg erfolgte am Kollektiv von 62 Patienten mit chronischer HBV-Infektion unter antiviraler Therapie mit TDF (245 mg / Tag, n = 39) oder LAM (100 mg / Tag, n = 24).

Die Auswertung erfolgte in 3 Gruppen:

- Gruppe 1: HBeAg-positive Patienten, bei denen keine HBeAg-Serokonversion innerhalb des Beobachtungszeitraums nachgewiesen wurde..
- Gruppe 2: Patienten mit HBeAg-Serokonversion innerhalb des Beobachtungszeitraums.
- Gruppe 3: HBeAg-negative Patienten.

Tab. 33 Patientencharakteristik der Gruppen 1 - 3. Die Einteilung der Patienten mit chronischer HBV-Infektion und unter Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 46) oder LAM 100 mg / Tag (n = 16) erfolgte entsprechend des HBeAg-Befundes vor Therapiebeginn und einer nachgewiesenen HBeAg-Serokonversion (HBeAg-Sk) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

|  | <b>HBeAg-positiv +<br/>keine HBeAg-Sk<br/>[1]<br/>(n = 35)</b> | <b>HBeAg-positiv +<br/>HBeAg-Sk[2]<br/>(n = 15)</b> | <b>HBeAg negativ [3]<br/>(n = 12)</b> |
|--|--|---|---------------------------------------|
| Geschlecht (m/w)                               | 25 / 10  | 12 / 3  | 11 / 1                                |
| Alter in Jahren*                               | 43 ± 13 [18 - 74]  | 41 ± 15 [19 - 74]                                   | 52 ± 17 [24 - 70]                     |
| Körpergewicht in kg*                           | 72 ± 11 [41 - 89]  | 72 ± 15 [47-100]                                    | 75 ± 10 [65 - 95]                     |
| Therapie TDF / LAM                             | 30 / 5   | 6 / 9   | 10 / 2                                |
| ALT in IU/mL*                                  | 55 ± 30 [23 - 143]   | 191 ± 202 [26 - 816]                                | 216 ± 13 [19 - 1523]                  |
| Beobachtungszeit in<br>Monaten*                | 29 ± 16 [4 - 64]   | 35 ± 18 [4 - 64]                                    | 25 ± 10 [7-40]                        |
| HBsAg-Serokonversion                           | 0  | 1   | 1                                     |
| * Mittelwert ± Standardabweichung [Spannweite] |  |   |                                       |

### ***4.4 Polyadenylierte HBV-RNA im Serum vor Therapiebeginn***

Die nachfolgenden Berechnungen und Darstellungen erfolgten alle an dem Kollektiv der Patienten mit chronischer HBV-Infektion (n = 79).

#### 4.4.1 Serumkonzentrationen der HBV-trRNA und -fIRNA im Vergleich

Bei 73 von 79 Patienten wurde HBV-trRNA und bei 74 von 79 Patienten wurde HBV-fIRNA zu Therapiebeginn nachgewiesen.

Bezüglich der qualitativen Analyse, d.h. der Nachweisbarkeit von HBV-trRNA und -fIRNA konnte kein Unterschied zwischen beiden HBV-RNAs festgestellt werden (McNemar-Test  $p = 0,73$ ). Demnach waren im selben Serum meist beide HBV-RNA-Formen nachweisbar.

Die Spannweite und Mittelwerte Serumkonzentrationen der HBV-trRNA und -fIRNA sind in Tabelle 34 dargestellt. Der Vergleich der absoluten Serumkonzentrationen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,053$ ), aber eine Tendenz: Die Konzentrationen zirkulierender HBV-trRNA waren zu Therapiebeginn im Mittel 3,5-fach höher als die zirkulierender HBV-fIRNA.

Tab. 34 Spannweite und Mittelwerte der Konzentrationen der HBV-trRNA und -fIRNA vor Therapiebeginn (n = 79). Signifikanzunterschied der beiden RNAs.

|                                       | <b>HBV-trRNA</b>    | <b>HBV-fIRNA</b>    | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Spannweite in Kopien / ml             | 0 - $3 \times 10^8$ | 0 - $1 \times 10^8$ |               |
| Mittelwert in Kopien / ml             | $1,83 \times 10^7$  | $5,17 \times 10^6$  |               |
| Mittelwert in $\log_{10}$ Kopien / ml | $5,31 \pm 2,18$     | $4,95 \pm 2,18$     | 0,053         |

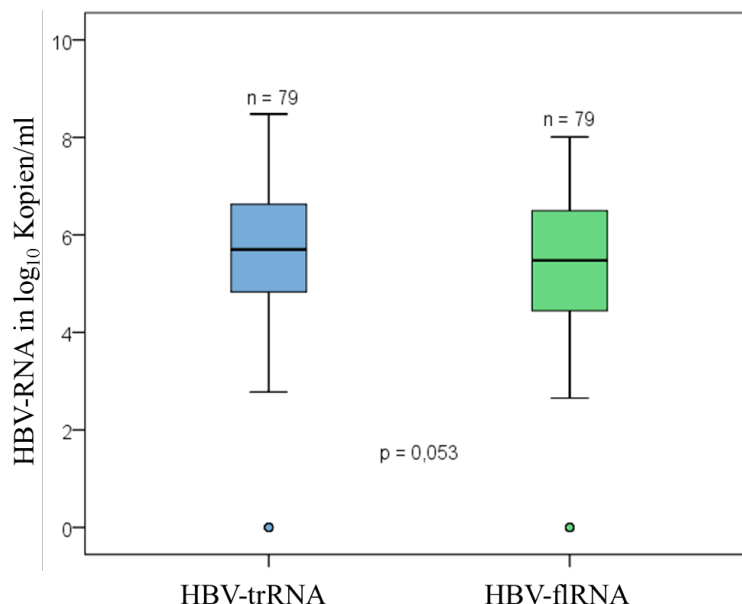


Abb.21 Boxplots der Konzentrationen der HBV-trRNA und -fIRNA zu Therapiebeginn.

## Ergebnisse

Betrachtet man nicht nur die Mittelwerte, sondern korreliert alle Messwerte der HBV-trRNA und -flRNA zu Therapiebeginn, zeigt sich eine starke lineare Korrelation der beiden RNA-Formen (Pearsons Korrelationskoeffizient  $r = 0,75$ , Abbildung 22).

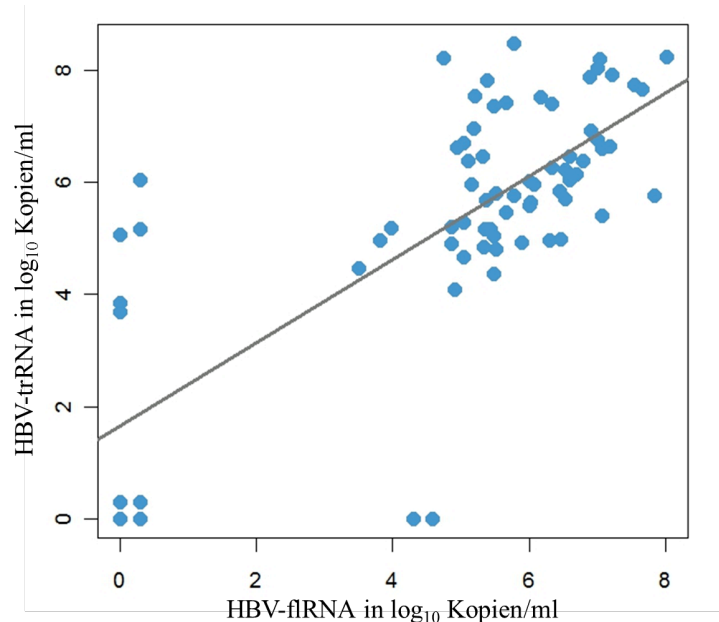


Abb. 22 Korrelation der HBV-trRNA und HBV-flRNA der Patienten mit chronischer HBV-Infektion vor Therapiebeginn ( $n = 79$ ). Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient liegt bei  $r = 0,75$ .

### 4.4.2 HBV-RNA im Vergleich zu anderen Parametern

Die Konzentrationen der HBV-trRNA und -flRNA zu Therapiebeginn wurden mit den anderen Parametern HBV-DNA-, HBsAg-, ALT-Konzentrationen, HBV-Genotyp, Alter und Geschlecht verglichen.

#### HBV-DNA

Die qualitative Analyse der Messungen hinsichtlich der Nachweisbarkeit von HBV-trRNA und -flRNA bei gleichzeitiger Nachweisbarkeit von HBV-DNA im Serum zeigte keinen signifikanten Unterschied, aber auch keinen starken Zusammenhang (McNemar-Test HBV-trRNA und HBV-DNA  $p = 0,18$ ; HBV-flRNA und HBV-DNA  $p = 0,04$ ). Demnach wurde nicht in jedem Serum, das HBV-DNA enthielt, auch HBV-trRNA oder -flRNA und anders herum nachgewiesen.

Die quantitative Analyse zeigte hingegen starke Korrelationen sowohl der HBV-trRNA als auch der HBV-flRNA mit der HBV-DNA-Konzentrationen (Abbildungen 23 und 24).



## Ergebnisse

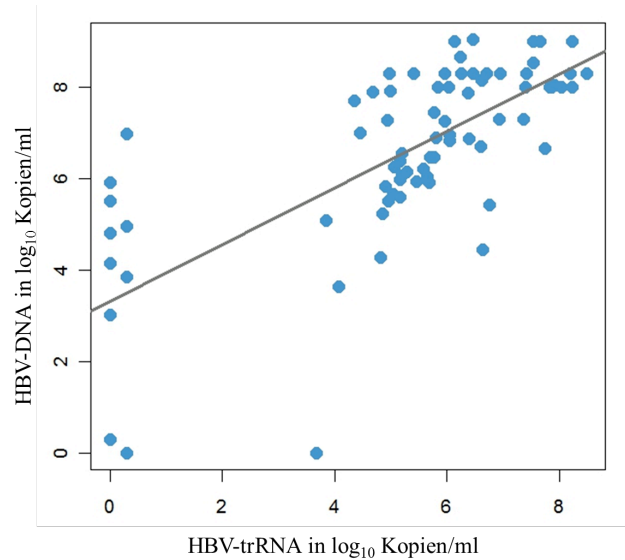


Abb. 23 Korrelation der HBV-trRNA und HBV-DNA der Patienten mit chronischer HBV-Infektion vor Therapiebeginn (n = 79). Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient liegt bei  $r = 0,71$ .

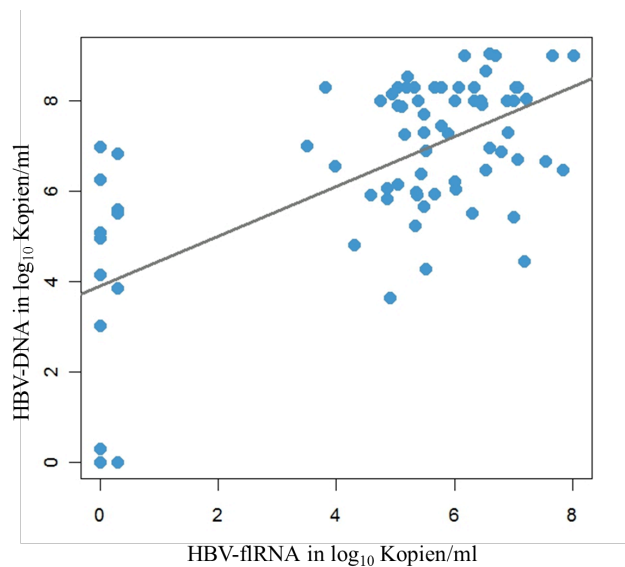


Abb. 24 HBV-fIRNA und HBV-DNA der Patienten mit chronischer HBV-Infektion und anschließender Therapie mit TDF oder LAM vor Therapiebeginn (n = 79). Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient liegt bei  $r = 0,64$ .

## Ergebnisse

Tab. 35 Mittelwerte der Virusparameter vor Therapiebeginn (n = 79).

|  | Mittelwert | Standardabweichung | Spannweite |
|--|------------|--------------------|------------|
| HBV-trRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 5,31       | 2,18               | 0 - 8,48   |
| HBV-flRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 4,80       | 2,18               | 0 - 8,01   |
| HBV-DNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml   | 6,57       | 2,00               | 0 - 9,04   |
| HBsAg in log <sub>10</sub> IU / ml         | 3,67       | 1,00               | 0 - 5,55   |
| ALT in IU / ml                             | 107,5      | 196,4              | 19 - 1523  |
| Alter in Jahren                            | 45         | 14                 | 15 - 74    |

Tab. 36 Signifikanzunterschiede und Pearson's Korrelationskoeffizienten der Virusparameter vor Therapiebeginn. \*T-Test + Pearson's Korrelationskoeffizient, \*\* Wilcoxon-Test + Spearman-Korrelation.

|                            | p-Wert  | Korrelationskoeffizient |
|----------------------------|---------|-------------------------|
| HBV-trRNA vs. HBV-DNA*     | < 0,001 | 0,71                    |
| HBV-flRNA vs. HBV-DNA*     | < 0,001 | 0,64                    |
| HBV-trRNA vs. HBsAg*       | < 0,001 | 0,30                    |
| HBV-flRNA vs. HBsAg*       | < 0,001 | 0,29                    |
| HBV-trRNA vs. ALT*         | < 0,001 | 0,10                    |
| HBV-flRNA vs. ALT*         | < 0,001 | 0,04                    |
| HBV-trRNA vs. Alter        | < 0,001 | -0,14                   |
| HBV-flRNA vs. Alter        | < 0,001 | -0,22                   |
| HBV-trRNA vs. Genotyp**    | < 0,001 | 0,28                    |
| HBV-flRNA vs. Genotyp**    | < 0,001 | 0,88                    |
| HBV-trRNA vs. Geschlecht** | < 0,001 | 0,61                    |
| HBV-flRNA vs. Geschlecht** | < 0,001 | 0,08                    |

### HBsAg

Zu Therapiebeginn wurden im Mittel HBsAg-Konzentrationen von  $3,67 \pm 1,00 \log_{10}$  IU / ml gemessen. Serumwerte des HBsAg korrelierten allerdings weder mit denen der HBV-trRNA ( $r = 0,30$ ) noch mit denen der HBV-flRNA ( $r = 0,29$ ).

### ALT

Ferner zeigte sich keine Korrelation der Serumkonzentrationen der HBV-trRNA oder -flRNA mit der Höhe der Alanintransaminase.

Zudem wurde kein Einfluss von Alter, Geschlecht oder HBV-Genotyp auf die Höhe der HBV-trRNA oder -flRNA vor Beginn der antiviralen Behandlung (Tabellen 35 und 36 und Abbildung 25) nachgewiesen. In der Tabelle 36 sind die Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Parameter unserer gesamten Patientenkohorte mit chronischer HBV-Infektion dargestellt. Die Abbildung 25 zeigt in Form einer Heatmap die Korrelationen der verschiedenen Parameter am Kollektiv, an dem die weiterführenden Berechnungen unter antiviraler Therapie (n = 62), erfolgten.

## Ergebnisse

Alter, HBV-Genotyp oder ALT-Konzentrationen korrelieren vor Therapiebeginn nicht mit HBV-trRNA bzw. -fIRNA. Eine starke Korrelation der HBV-RNA-Formen untereinander und mit der HBV-DNA zeigt sich hingegen.

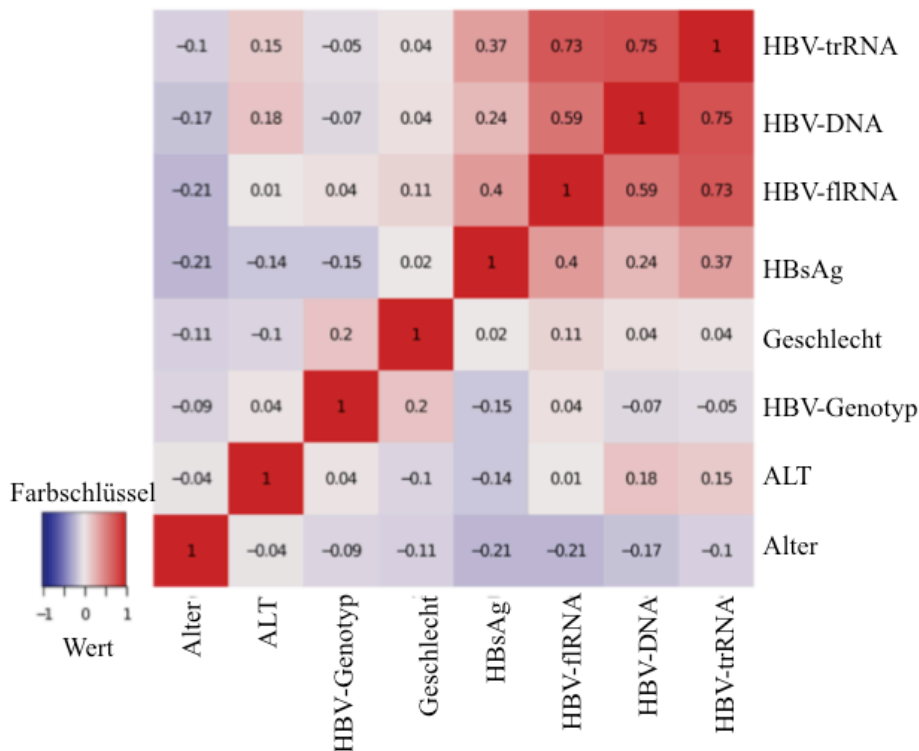


Abb. 25 Heatmap der paarweisen Korrelationen der einzelnen Parameter vor Therapiebeginn (n = 62), aus van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Rot steht für eine starke positive, blau für eine starke negative Korrelation, weiße und blass-gefärbte Rechtecke zeigen keine bis schwache Korrelationen der jeweiligen Parameter. Die Zahlenwerte in den Quadraten entsprechen dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

### 4.4.3 Vergleich HBeAg-positiver und HBeAg-negativer Patienten

Beim Vergleich der Patienten mit chronischer HBV-Infektion hinsichtlich ihres HBeAg-Status zu Therapiebeginn zeigten sich im Mittel höhere Konzentrationen der HBV-trRNA, HBV-fIRNA, HBV-DNA und des HBsAg bei HBeAg-positiven Patienten im Vergleich zu HBeAg-negativen Patienten.

Die Unterschiede für HBV-trRNA, HBV-fIRNA und HBsAg waren signifikant ( $p < 0,05$ ), die Unterschiede der HBV-DNA mit  $p = 0,066$  nicht signifikant (Tabelle 37).

Demnach haben HBeAg-negative im Vergleich zu HBeAg-positiven Patienten im Mittel nicht nur geringere Konzentration der HBV-DNA und des HBsAg, sondern auch der HBV-trRNA und -fIRNA.

## Ergebnisse

Tab. 37 Mittelwerte der HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA, HBsAg  $\pm$  Standardabweichung [Spannweite] vor Therapiebeginn entsprechend des HBeAg-Status vor Therapiebeginn.

|  | <b>HBeAg-positiv<br/>(n = 66)</b> | <b>HBeAg-negativ<br/>(n = 13)G</b> | <b>p-Wert</b> |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|---------------|
| HBV-trRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 5,7 $\pm$ 1,9<br>[0 - 8,5]        | 3,5 $\pm$ 2,5<br>[0 - 6,04]        | 0,010         |
| HBV-flRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 5,3 $\pm$ 2,1<br>[0 - 8,1]        | 3,5 $\pm$ 2,2<br>[0 - 5,9]         | 0,016         |
| HBV-DNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml   | 6,7 $\pm$ 2,0<br>[0 - 9,0]        | 5,7 $\pm$ 1,6<br>[1,5 - 8,3]       | 0,066         |
| HBsAg in log <sub>10</sub> IU / ml         | 3,8 $\pm$ 0,8<br>[1,2 - 5,6]      | 2,8 $\pm$ 1,4<br>[0 - 3,8]         | 0,042         |

### ***4.5 Kinetik polyadenylierter HBV-RNA im Serum unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga***

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Kinetik der bekannten Virusparameter im Vergleich zu HBV-trRNA und -flRNA bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion unter antiviraler Therapie. Diese Untersuchungen wurden an 62 Patienten durchgeführt, die den erweiterten Ausschlusskriterien entsprachen (Abschnitt 4.3.3).

Nach Therapiebeginn mit TDF oder LAM wurden einerseits Verläufe mit rapidem Abfall sowohl der zirkulierenden HBV-DNA als auch der HBV-trRNA und -flRNA beobachtet. Andererseits zeigten sich Verläufe mit rapidem Abfall der HBV-DNA, aber mit Persistenz oder maximal leichten Abfall der beiden HBV-RNA-Formen.

Die genauere Analyse ergab, dass Patienten mit konsekutiver HBeAg-Serokonversion eine schnellere Suppression der Virusnukleinsäuren HBV-DNA, HBV-trRNA und HBV-flRNA innerhalb von maximal 50 Monaten (im Mittel 15 Monaten) zeigten.

Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte die Einteilung in die unter Abschnitt 4.3.3 genannten Gruppen (Tabelle 33).

In der Tabelle 38 sind die Mittelwerte der HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA und HBsAg zu Therapiebeginn sowie nach 3 und 6 Monaten Therapie innerhalb der 3 Gruppen (HBeAg-positiv zu Therapiebeginn mit oder ohne folgende HBeAg-Serokonversion und HBeAg-negative) dargestellt.

## Ergebnisse

Tab. 38 Mittelwerte der HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA, HBsAg  $\pm$  Standardabweichung [Spannweite] zu Therapiebeginn, nach 3 und 6 Monaten Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 39) oder LAM 100 mg / Tag (n = 24).

|  | <b>Zeit in Monaten nach Therapiebeginn</b> | <b>HBeAg-positiv + keine HBeAg-Sk [1] (n = 35)</b> | <b>HBeAg-positiv + HBeAg-Sk [2] (n = 15)</b> | <b>p-Wert 1 vs. 2</b> | <b>HBeAg negativ [3] (n = 12)</b> | <b>p-Wert 2 vs. 3</b> |
|--|--|--|--|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| HBV-trRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 0  | 5,5 $\pm$ 1,9<br>[0 - 8,2]                         | 5,8 $\pm$ 2,3<br>[0 - 8,5]                   | 0,599                 | 3,4 $\pm$ 2,6<br>[0 - 6,0]        | 0,018                 |
|  | 3  | 4,8 $\pm$ 1,7<br>[0 - 7,8]                         | 2,2 $\pm$ 2,2<br>[0 - 6,1]                   | 0,001                 | 2,3 $\pm$ 2,0<br>[0 - 5,1]        | 0,843                 |
|  | 6  | 4,8 $\pm$ 2,0<br>[0 - 7,4]                         | 1,1 $\pm$ 1,4<br>[0 - 2,8]                   | <0,001                | 1,5 $\pm$ 1,9<br>[0 - 4,7]        | 0,690                 |
| HBV-flRNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml | 0  | 5,6 $\pm$ 1,9<br>[0 - 8,0]                         | 4,6 $\pm$ 2,1<br>[0 - 6,5]                   | 0,106                 | 3,4 $\pm$ 2,3<br>[0 - 5,9]        | 0,186                 |
|  | 3  | 5,2 $\pm$ 2,1<br>[0 - 8,3]                         | 2,0 $\pm$ 2,3<br>[0 - 6,5]]                  | 0,002                 | 3,3 $\pm$ 2,2<br>[0 - 5,0]        | 0,335                 |
|  | 6  | 5,3 $\pm$ 1,9<br>[0 - 7,9]                         | 0,7 $\pm$ 1,2<br>[0 - 2,7]]                  | <0,001                | 1,8 $\pm$ 2,2<br>[0 - 5,5]        | 0,296                 |
| HBV-DNA in log <sub>10</sub> Kopien / ml   | 0  | 6.5 $\pm$ 2,0<br>[1.5-9.0]                         | 7,1 $\pm$ 1,8<br>[3,0-8,0]                   | 0,247                 | 5.5 $\pm$ 1.4 [1.5-7.3]           | 0,016                 |
|  | 3  | 4.2 $\pm$ 1.4<br>[1.5-6,2]                         | 3.2 $\pm$ 1,8<br>[0-5.7]                     | 0,165                 | 3.8 $\pm$ 1.2 [1.5-6.7]           | 0,596                 |
|  | 6  | 3.2 $\pm$ 1.7<br>[0-7.0]                           | 2,3 $\pm$ 1,0<br>[0-3.4]                     | 0,072                 | 2.6 $\pm$ 0.9 [1.5-4.1]           | 0,069                 |
| HBsAg in log <sub>10</sub> IU / ml         | 0  | 3.9 $\pm$ 0.7<br>[2.5-5,5]                         | 3.9 $\pm$ 1,0<br>[1.2-4.9]                   | 0,829                 | 2.7 $\pm$ 1.4 [0.8-3.8]           | 0,064                 |
|  | 3  | 4,1 $\pm$ 0.7<br>[3,5-5,6]                         | 2,9 $\pm$ 2,6<br>[0-4.8]                     | 0,498                 | 2.6 $\pm$ 1.4 [0.8-3.8]           | 0,407                 |
|  | 6  | 3,7 $\pm$ 0,9<br>[0-5,0]                           | 3.6 $\pm$ 0.9<br>[2,5-4,8]                   | 0,720                 | 2.6 $\pm$ 1.5 [1-3.8.0]           | 0,544                 |

### 4.5.1 HBV-trRNA und HBV-flRNA im Vergleich

- Zu keinem Untersuchungszeitpunkt wurden im Mittel hoch signifikante Unterschiede der Konzentrationen zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA nachgewiesen (Tabelle 39).
- Zu Beginn der antiviralen Behandlung war die Serumkonzentration der HBV-trRNA im Mittel höher als die der HBV-flRNA, wie unter 3.4.1 dargestellt. Unter Therapie allerdings lagen die Werte der HBV-flRNA im Mittel oberhalb der HBV-trRNA in den

## Ergebnisse

Gruppen nach 3- und 6-monatiger Therapie, aber zu Monat 3 nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 39).

Demzufolge führte bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion die Therapie mit TDF oder LAM zumindest von Therapiebeginn bis Monat 3 zu einer stärkeren Suppression der HBV-trRNA im Vergleich zur HBV-flRNA.

- In der Gruppe der stets HBeAg-positiven Patienten (Gruppe 1) zeigten sich ein geringer Abfall der HBV-trRNA und der HBV-flRNA nach 3- und 6-monatiger Therapie mit TDF oder LAM (Tabelle 38). Die Mittelwerte der Serumkonzentrationen der HBV-RNAs unterschieden sich signifikant von denen der Patienten, die unter Therapie eine HBeAg-Serokonversion erreichten (Gruppe 2). In dieser Gruppe zeigte sich ein starker Abfall bereits nach 3-monatiger Therapie sowohl zirkulierender HBV-trRNA als auch HBV-flRNA.

Tab. 39 Signifikanzwerte der Konzentrationen von HBV-trRNA und -flRNA vor Therapiebeginn, nach 3 und 6 Monaten Therapie innerhalb der Gruppen 1 - 3.

| p-Wert HBV-trRNA vs. HBV-flRNA | HBeAg-positiv + keine HBeAg-Sk [1] (n = 35) | HBeAg-positiv + HBeAg-Sk [2] (n = 15) | HBeAg negativ [3] (n = 12) |
|--------------------------------|---|---------------------------------------|----------------------------|
| Monat 0                        | 0,499                                       | 0,003                                 | 0,963                      |
| Monat 3                        | 0,158                                       | 0,722                                 | 0,169                      |
| Monat 6                        | 0,007                                       | 0,307                                 | 0,269                      |

Die Abbildungen 26 und 27 zeigen in Form von Boxplots die Serumkonzentrationen der HBV-trRNA und HBV-flRNA in den 3 Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten.

## Ergebnisse

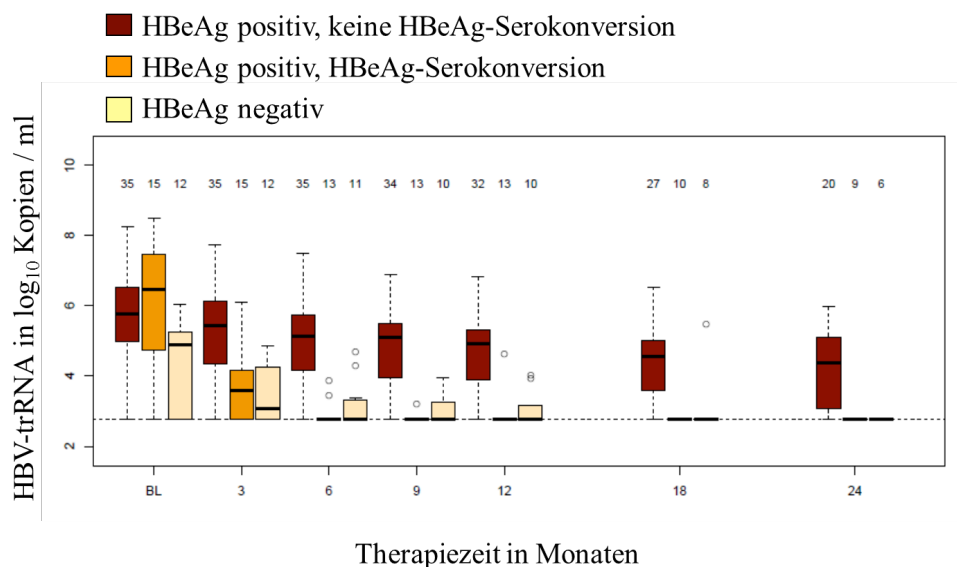


Abb. 26 HBV-trRNA zu Therapiebeginn und nach 3, 6, 9, 12, 18, 24 Monaten Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 39) oder LAM 100 mg / Tag (n = 24), nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Die Anzahl der Patienten, die zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht wurden, ist oberhalb der Box-Plots angegeben.

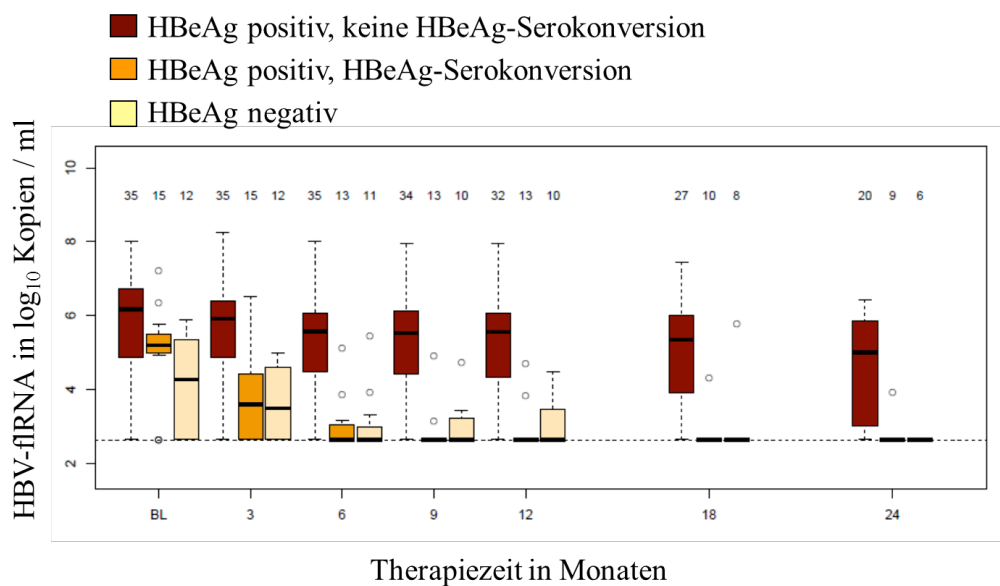


Abb. 27 HBV-flRNA zu Therapiebeginn und nach 3, 6, 9, 12, 18, 24 Monaten Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 39) oder LAM 100 mg / Tag (n = 24), nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Die Anzahl der Patienten, die zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht wurden, ist oberhalb der Box-Plots angegeben.

#### 4.5.2 Assoziation von HBV-DNA-Konzentrationen mit HBeAg-Serokonversion

- In allen Patientengruppen zeigte sich im Mittel nach 3- und 6-monatiger Therapie mit TDF oder LAM ein Abfall der HBV-DNA (Tabelle 38).
- HBeAg-positive Patienten (Gruppe 1 und 2) hatten zu Therapiebeginn im Mittel eine höhere Viruslast ( $6,5 \log_{10}$  Kopien / ml und  $7,1 \log_{10}$  Kopien / ml) als HBeAg-negative Patienten ( $5,5 \log_{10}$  Kopien / ml).
- Es zeigte sich auch eine stärkere Suppression der HBV-DNA bei HBeAg-positiven Patienten mit nachfolgender HBeAg-Serokonversion (Gruppe 2) im Vergleich zu den stets HBeAg-positiven Patienten (Gruppe 1) als auch den HBeAg-negativen Patienten (Gruppe 3), welche im Vergleich zur HBV-trRNA und -fRNA erst nach 6-monatiger Therapie mit TDF oder LAM signifikant ist (Tabelle 38).

Die Abbildung 28 visualisiert in Form von Boxplots die Konzentrationen der HBV-DNA der 3 Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten.

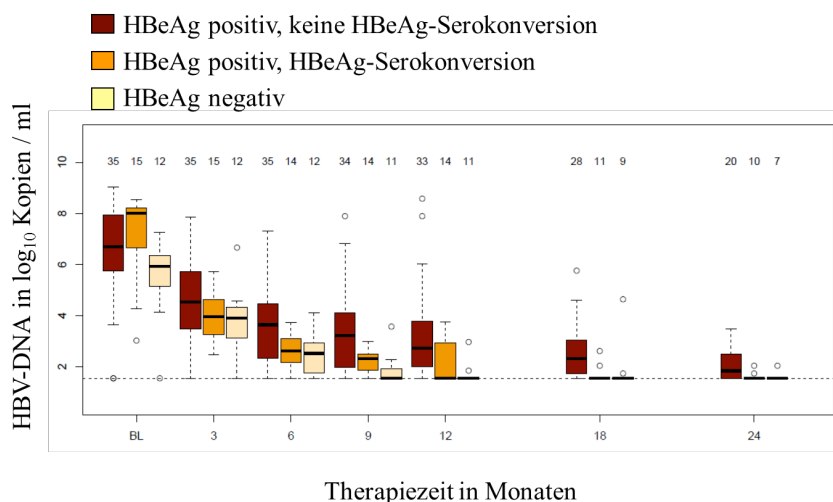


Abb. 28 HBV-DNA zu Therapiebeginn und nach 3, 6, 9, 12, 18, 24 Monaten Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 39) oder LAM 100 mg / Tag (n = 24), nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Die Anzahl der Patienten, die zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht wurden, ist oberhalb der Box-Plots angegeben.

#### 4.5.3 Assoziation von HBsAg-Konzentrationen mit HBeAg-Serokonversion

- Auch die Serumkonzentrationen des HBsAg lagen sowohl zu Therapiebeginn als auch nach 3- und 6-monatiger Therapie mit TDF oder LAM im Mittel bei HBeAg-positiven Patienten höher als bei HBeAg-negativen Patienten (Tabelle 38).



## Ergebnisse

- In den Gruppen der stets HBeAg-positiven Patienten (Gruppe 1) und der HBeAg-negativen Patienten (Gruppe 3) wurde durch die Therapie mit TDF oder LAM im Mittel keine Suppression des HBsAg erreicht (Tabelle 38).
- Bei HBeAg-positiven Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraums eine HBeAg-Serokonversion nachwiesen, stellte sich ein leichter Abfall der mittleren HBsAg-Konzentration von 3,9 log<sub>10</sub> IU / ml zu Therapiebeginn auf 3,6 log<sub>10</sub> IU / ml nach 6 Monaten TDF oder LAM dar.

Dennoch gab es in den ersten 6 Monaten Therapie zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der HbsAg-Konzentrationen innerhalb der Gruppen 1 bis 3.

Die Abbildung 29 stellt die Konzentrationen des HBsAg der 3 Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten dar.

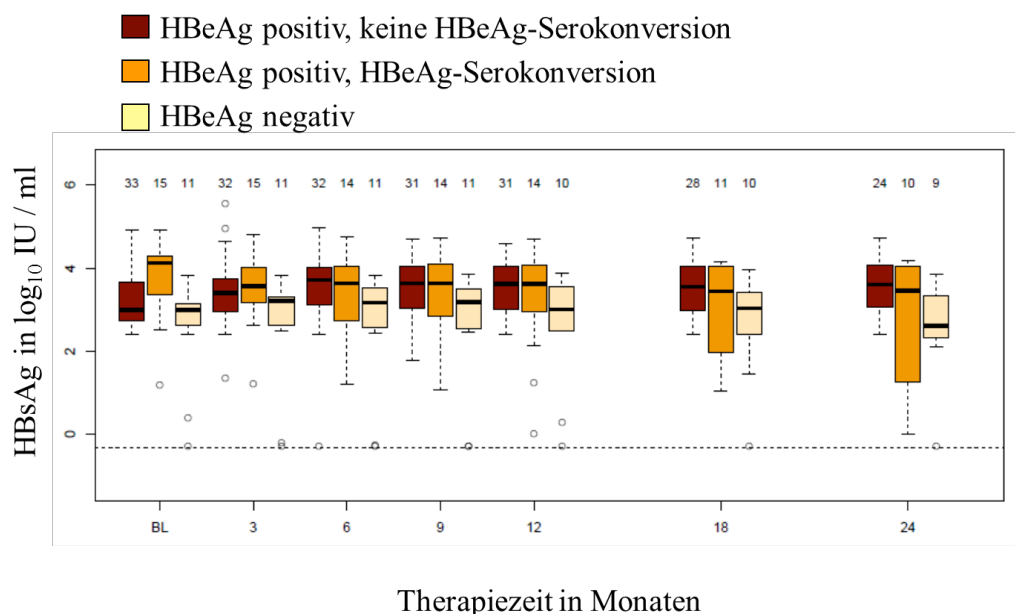


Abb. 29 HBsAg zu Therapiebeginn und nach 3, 6, 9, 12, 18, 24 Monaten Therapie mit TDF 245 mg / Tag (n = 39) oder LAM 100 mg / Tag (n = 24), nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Die Anzahl der Patienten, die zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht wurden, ist oberhalb der Box-Plots angegeben.

### 4.5.4 Assoziation von HBV-RNA-Konzentrationen vor und während antiviraler Therapie mit HBeAg-Serokonversion

Wie bereits zuvor in dieser Arbeit dargestellt, wiesen HBeAg-positive Patienten, bei denen im Beobachtungszeitraum eine HBeAg-Serokonversion registriert werden konnte, deutliche Unterschiede in der Kinetik der HBV-DNA und vor allem der HBV-trRNA und -flRNA auf

## Ergebnisse

(Tabelle 38). Zeigten sich vor Therapiebeginn bei HBeAg-positiven Patienten, mit und ohne konsekutiver HBeAg-Serokonversion unter antiviraler Therapie, ähnlich hohe Konzentrationen der HBV-trRNA von xxx und der HBV-flRNA von, so zeichnete sich bereits nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM eine stärkere Suppression der HBV-trRNA und HBV-flRNA um mehr als 2,6  $\log_{10}$  Kopien / ml ab (Abbildungen 26 und 27, Tabelle 38). Wohingegen stets HBeAg-positive Patienten lediglich einen Abfall der HBV-RNA von  $< 1,0 \log_{10}$  Kopien / ml aufwiesen.

Die HbsAg-Konzentrationen fielen bei allen HBeAg-positiven Patienten im Mittel unter Therapie nur wenig ab (Abbildung 29, Tabelle 38), sodass signifikant kein Unterschied hinsichtlich der konsekutiven HBeAg-Serokonversion dargestellt wurde.

Die Abbildung 30 veranschaulicht am Beispiel der HBV-trRNA zum einen die Kinetiken der HBV-RNA- und der HBsAg-Konzentrationen und zum anderen die Anzahl der HBeAg-Serokonversionen zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Interessanter Weise war die Suppression der HBV-RNA deutlich früher als die HBeAg-Serokonversion nachweisbar. Bei 3 Patienten war HBeAg bereits nach 3 Monaten Therapie nicht mehr nachweisbar, bei einem Patienten fand die Serokonversion hingegen erst nach 56 Monaten statt.

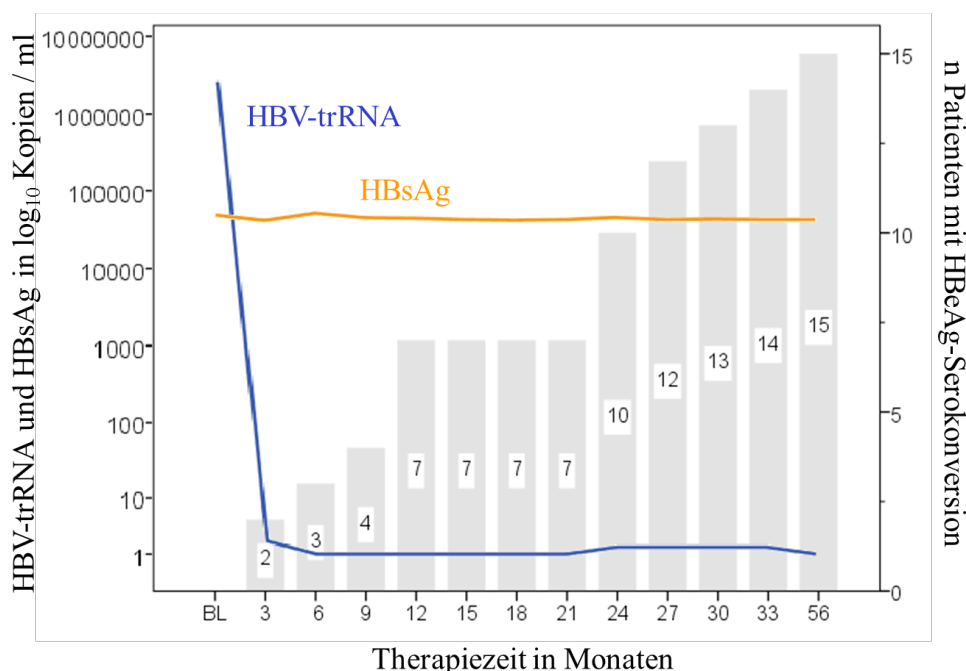


Abb. 30 Serumkonzentrationen der HBV-trRNA und des HBsAg der HBeAg-positiven Patienten mit HBeAg-Serokonversion im Verlauf (n = 15). Die Balken repräsentieren die Anzahl der Patienten, bei denen zum jeweiligen Zeitpunkt schon eine HBeAg-Serokonversion nachgewiesen werden konnte.

## Ergebnisse

Bei allen HBeAg-positiven Patienten mit HBeAg-Serokonversion im Verlauf (n = 15) konnten Suppressionen der HBV-trRNA, der HBV-flRNA und der HBV-DNA unter die jeweilige Testnachweisgrenze durch die Therapie mit TDF oder LAM erreicht werden.

Die Abbildung 31 visualisiert als Boxplots die Zeitspannen je von Therapiebeginn bis zum Zeitpunkt der Unterschreitung der Testnachweisgrenze der Parameter HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA und HBeAg.

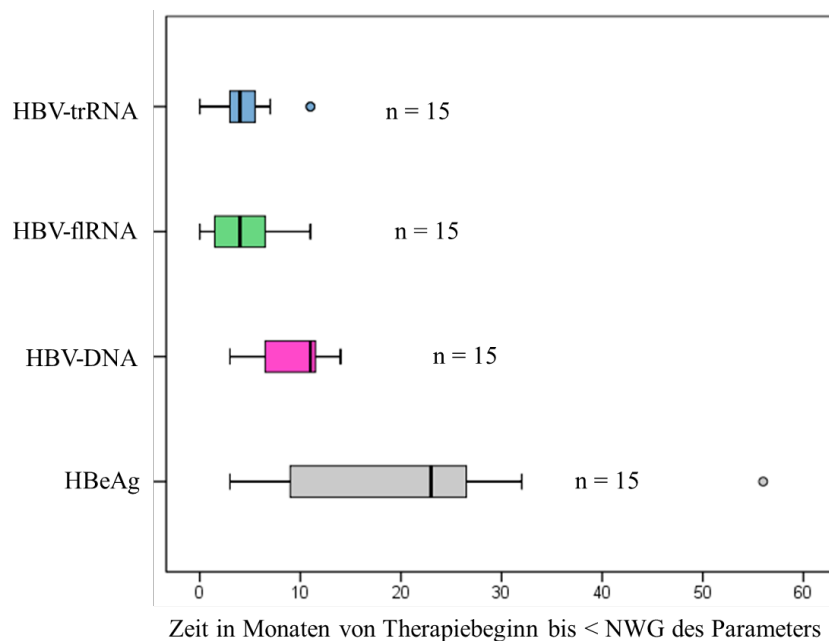


Abb. 31 Zeit von Therapiebeginn bis zum Abfall der HBV-trRNA, HBV-flRNA und HBV-DNA unter die Nachweisgrenze in Monaten und Zeit bis zur HBeAg-Serokonversion bei HBeAg-positiven Patienten in Monaten (n = 15).

Zirkulierende HBV-trRNA und -flRNA waren im Mittel  $19 \pm 14$  (Spannweite 3 - 56) Monate nicht mehr nachweisbar und damit bereits 15 Monate vor der Zeitpunkt der konsekutiven HBeAg-Serokonversion,

Zirkulierende HBV-trRNA und -flRNA fielen im Mittel bereits 6 Monate früher als die HBV-DNA unter die Testnachweisgrenzen ab. Diese zeitlichen Unterschiede waren signifikant (Tabellen 40 und 41).

## Ergebnisse

Im Vergleich fielen auch bei 24 von 36 HBeAg-positiven Patienten, die im Beobachtungszeitraum keine HBeAg-Serokonversion erzielen konnten (Gruppe 1), die HBV-DNA unter die Nachweisgrenze ab. Eine Suppression der HBV-trRNA und -flRNA unter die Nachweisgrenzen war hingegen nur bei 15 bzw. 14 der 36 Patienten zu verzeichnen.

Tab. 40 Zeit in Monaten von Therapiebeginn bis zum Abfall unter die Nachweisgrenze von HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA, HBeAG im Serum innerhalb der Gruppe 2 (n = 15).

|                                      | <b>HBV-trRNA</b>          | <b>HBV-flRNA</b>          | <b>HBV-DNA</b>            | <b>HBeAg</b>                |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Mittelwerte $\pm$ SD<br>[Spannweite] | 4,4 $\pm$ 3,4<br>[0 - 11] | 4,4 $\pm$ 3,6<br>[0 - 11] | 9,0 $\pm$ 3,7<br>[3 - 14] | 19,5 $\pm$ 14,2<br>[3 - 56] |

Tab. 41 Zeit in Monaten von Verlust der Nachweisbarkeit von HBV-trRNA, HBV-flRNA und HBV-DNA bis zur HBeAG-Serokonversion im Serum innerhalb der Gruppe 2 (n = 17).

| <b>Differenzen</b>                   | <b>HBeAg-trRNA</b>          | <b>HBeAg - flRNA</b>        | <b>HBeAg - DNA</b>          |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Mittelwerte $\pm$ SD<br>[Spannweite] | 15,1 $\pm$ 13,1<br>[0 - 50] | 15,1 $\pm$ 12,7<br>[0 - 50] | 10,5 $\pm$ 15,8<br>[0 - 50] |

### 4.5.5 Multivariate Analyse der Assoziation verschiedener Parameter mit der HBeAg-Serokonversion

Zur Abschätzung der Faktoren, die mit der HBe-Serokonversion korrelieren, wurde ein multivariates Logit-Modell (logistischer Regression) verwendet. Dabei wurden folgende Parameter untersucht: Alter, Geschlecht, HBV Genotyp sowie folgende Parameter jeweils vor Therapiebeginn als auch die Differenzen nach 3- und nach 6-monatiger Therapie: HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA, HBsAg, ALT, zudem die Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze nach 3- und nach 6-monatiger Therapie. Aufgrund der hohen Korrelation der HBV-trRNA und -flRNA wurden zwei Modelle erstellt, die Regressionskoeffizienten der jeweiligen Parameter gegen den Regularisierungsparameter „lambda“ abbilden (Abbildung 34). Auch hier zeigte sich die Suppression der zirkulierenden HBV-RNA (trRNA und flRNA) unter Nukleos(t)id-Analoga-Therapie als stärkster einzelner linearer Faktor in Hinblick auf die konsekutive HBeAg-Serokonversion. Die Regressionskoeffizienten wurden durch 4-fache Kreuzvalidierung unter Verwendung des Penalisierungsp Parameters  $\alpha = 0,5$  berechnet.

## Ergebnisse

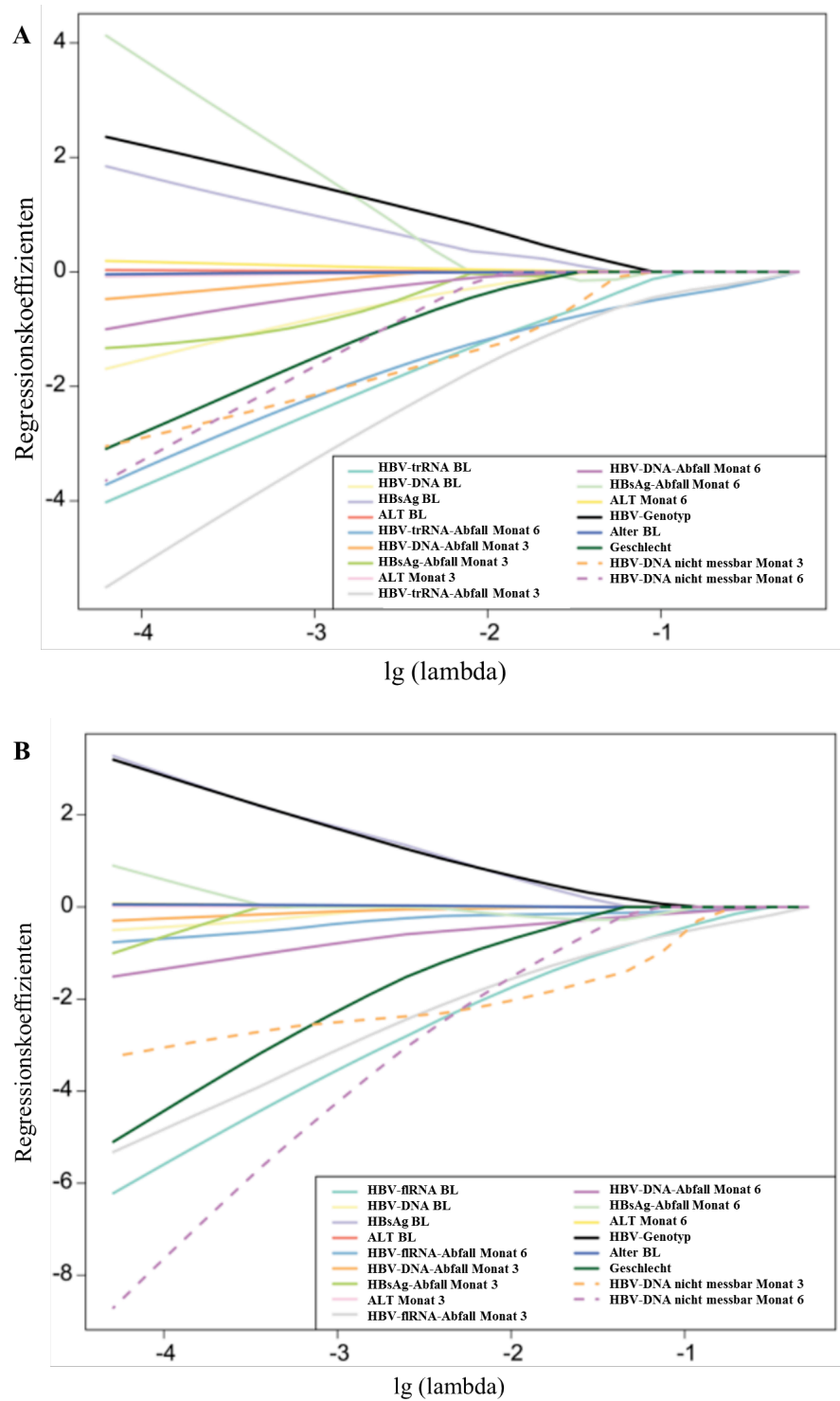


Abb. 34 Regressionskoeffizienten der Parameter im Elastic Net Modell gegen Regularisierungsparameter lambda für (A) HBV-trRNA und (B) HBV-flRNA nach van Bömmel und Bartens et al<sup>56</sup>. Jede Kurve entspricht einem Regressionskoeffizienten in Assoziation der Prädiktion der HBeAg-Serokonversion und zeigt die jeweilige Veränderung bei der Schrumpfung von lambda. Je kleiner lambda ist, wenn die Kurve die Nulllinie verlässt, desto stärker ist die Assoziation zur HBeAg-Serokonversion im multivariaten Modell.

In der multivariaten Analyse der HBV-trRNA zeigten folgende Parameter die höchste Korrelation mit der konsekutiven HBeAg-Serokonversion: (1) HBV-trRNA-Abfall zu Monat 3, (2) HBV-trRNA-Abfall zu Monat 6, (3) HBV-trRNA-Konzentration vor Therapiebeginn und (4) HbsAg-Abfall zu Monat 6. Unter antiviraler Therapie

In der multivariaten Analyse des Modells der HBV-flRNA zeigte folgende Reihenfolge der Parameter bezüglich der Korrelation mit konsekutiven HBeAg-Serokonversion: (1) HBV-flRNA-Abfall zu Monat 6, (2) HBV-flRNA-Konzentration vor Therapiebeginn, (3) HBV-DNA-Abfall zu Monat 6 und (4) HBV-DNA-Suppression unter die Nachweisgrenze zu Monat 3 unter antiviraler Therapie.

### **4.5.6 Vorhersagekraft des Abfalls polyadenylierter HBV-RNA im Serum hinsichtlich einer konsekutiven HBeAg-Serokonversion**

Diejenigen Faktoren, die sich im multivariaten Modell durch die höchste Assoziation mit der HBeAg-Serokonversion dargestellt hatten, wurden hinsichtlich ihrer Prädiktion für HBeAg-Serokonversion mittels Odds-Ratio und ROC-Kurven untersucht. Als ein auch im klinischen Alltag verwendbares Maß für die Änderungen der HBV-RNA wurde ein Rückgang von  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien / ml bzw.  $\geq 1,0 \log_{10}$  IU / ml veranschlagt.

Es wurden Berechnungen mit einer definierten Suppression der Parameter von  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien / ml bzw.  $\geq 1,0 \log_{10}$  IU / ml durchgeführt.

#### 1.) Odds Ratio (Tabellen 42 und 43):

- HBeAg-positive Patienten mit chronischer HBV-Infektion und Suppression zirkulierender HBV-trRNA um mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM, erreichten 3,81-mal häufiger eine konsekutive HBeAg-Serokonversion im Vergleich zu Patienten, bei denen die Therapie eine geringere Suppression der HBV-trRNA erreichte (Tabelle 42).
- Die Suppression zirkulierender HBV-flRNA um mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml führte 2,39-2,83-mal häufiger zur konsekutiven HBeAg-Serokonversion (Tabellen 42 und 43).
- Die Ergebnisse waren für beide HBV-RNAs signifikant ( $p \leq 0,001$ ).
- Der Abfall der HBV-DNA und des HbsAg um mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml bzw. um mehr als  $1,0 \log_{10}$  IU / ml führten mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zur konsekutiven

## Ergebnisse

HBeAg-Serokonversion. Allerdings waren die Ergebnisse weder nach 3- noch nach 6-monatiger Therapie signifikant (Tabellen 42 und 43).

- Die Odds Ratios der Suppression HBV-RNA, sowohl trRNA als auch flRNA, waren im Vergleich zur HBV-DNA-Suppression höher und belegen die bessere Prädiktion hinsichtlich der HBeAg-Serokonversion

Tab. 42 Odds Ratios des Abfalls der Konzentrationen der zirkulierenden HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml bzw. HBsAg  $\geq 1,0 \log_{10}$  IU/ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM hinsichtlich einer konsekutiven HBeAg-Serokonversion (n = 51), KI = Konfidenzintervall).

|           | <b>Odds Ratio<br/>(95% KI)</b> | <b>p-Wert (Wald-Test)</b> | <b>p-Wert (Likelihood-<br/>Ratio-Test)</b> |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|--|
| HBV-trRNA | 3,81 (1,75 – 8,31)             | < 0,001                   | < 0,001                                    |
| HBV-flRNA | 2,83 (1,35 – 5,93)             | 0,006                     | 0,001                                      |
| HBV-DNA   | 1,64 (1,07- 2,52)              | 0,023                     | 0,015                                      |
| HBsAg     | 2,36 (0,82 – 6,77)             | 0,111                     | 0,088                                      |

Tab. 43 Odds Ratios des Abfalls der Konzentrationen der zirkulierenden HBV-trRNA, HBV-flRNA, HBV-DNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml bzw. HBsAg  $\geq 1,0 \log_{10}$  IU/ml nach 6-monatiger Therapie mit TDF oder LAM hinsichtlich einer konsekutiven HBeAg-Serokonversion (n = 51, KI = Konfidenzintervall).

|           | <b>Odds Ratio<br/>(95% KI)</b> | <b>p-Wert (Wald-Test)</b> | <b>p-Wert (Likelihood-<br/>Ratio-Test)</b> |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|--|
| HBV-trRNA | 2,76 (1,59 – 4,81)             | < 0,001                   | < 0,001                                    |
| HBV-flRNA | 2,39 (1,31 – 4,35)             | 0,004                     | 0,001                                      |
| HBV-DNA   | 1,56 (1,04 – 2,35)             | 0,032                     | 0,017                                      |
| HBsAg     | 1,98 (0,89 – 4,41)             | 0,095                     | 0,070                                      |

### 2.) ROC-Kurven:

Zur Bewertung der Genauigkeit der Vorhersage der HBeAg-Serokonversion bei einer Suppression der HBV-trRNA bzw. -flRNA um mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM wurden ROC-Kurven angefertigt, aufgrund der höchsten Odds Ratios zu diesem Zeitpunkt (Abbildungen 32 und 33).

Die AUC („Area under Curve“) als Maß für die Güte des Tests war für den Cut-Off-Wert von  $1,0 \log_{10}$  Kopien HBV-trRNA / ml bei 0,85 und zeigte damit eine hohe Trennschärfe.

Die AUC war für den Cut-Off-Wert von  $1,0 \log_{10}$  Kopien HBV-flRNA / ml bei nur 0,73 und zeigt damit eine weniger gute Differenzierung.

## Ergebnisse

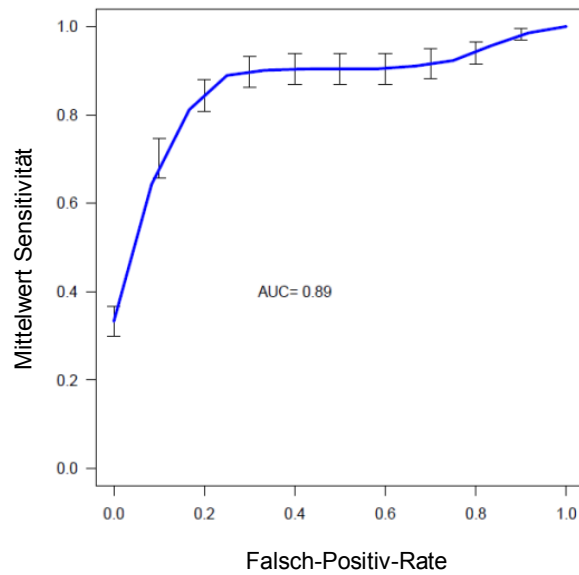


Abb.32 ROC-Kurve zur Beziehung der Falsch-Positiv-Rate und Sensitivität der Suppression der HBV-trRNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM hinsichtlich der folgenden HBeAg-Serokonversion (n = 15).

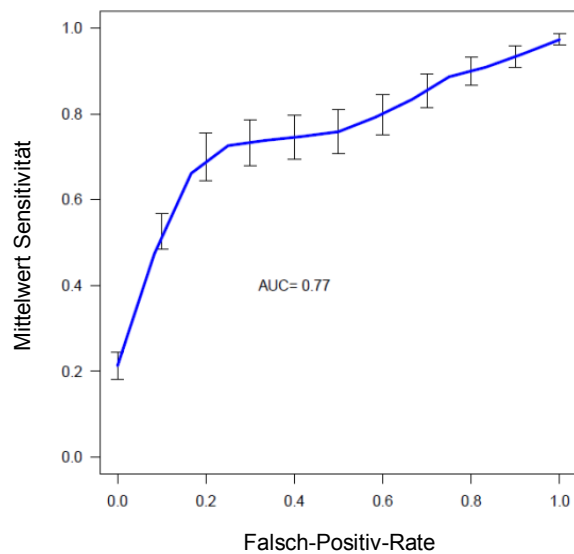


Abb.33 ROC-Kurve zur Beziehung der Falsch-Positiv-Rate und Sensitivität der Suppression der HBV-flRNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM hinsichtlich der folgenden HBeAg-Serokonversion (n = 15).



## Ergebnisse

### 3.) Diagnostische Sensitivität und Spezifität:

Die Suppression zirkulierender HBV-trRNA nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM um  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml prognostizierte mit einer Spezifität von 83,3% und einer Sensitivität von 80% zu einer HBeAg-Serokonversion (Abbildung 34).

Die Suppression zirkulierender HBV-flRNA um  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml zeigte mit einer Spezifität von 77,8% und mit einer Sensitivität von 66,7% eine konsekutive HBeAg-Serokonversion an (Abbildung 35).

### 4.) Prädiktive Werte:

Verringerte sich die Serumkonzentration der HBV-trRNA auf mindestens ein Zehntel nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM, folgte eine HBeAg-Serokonversion mit einer Wahrscheinlichkeit von 66,7%, (Tabelle 44, positiver prädiktiver Wert, PPV).

Aussagekräftiger war der negative Vorhersagewert (NPV): Wurde nach 3-monatiger antiviraler Behandlung die Suppression der HBV-trRNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml nicht erreicht, so folgte mit 90,9%-iger Wahrscheinlichkeit keine HBeAg-Serokonversion (Tabelle 44).

Tab. 44 Vierfeldertafel der HBeAg-positiven Patienten zur Suppression der HBV-trRNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF (245 mg / Tag) oder LAM (100 mg / Tag) und der konsekutiven HBeAg-Serokonversion (n = 51). PPV = Positiver Vorhersagewert, NPV = Negativer Vorhersagewert.

|   |      | HBeAg-Sk. |      | Summe | PPV   | NPV   |
|---|------|-----------|------|-------|-------|-------|
|   |      | Ja        | Nein |       |       |       |
| Abfall der HBV-trRNA<br>$\geq 1,0 \log_{10}$ zu Monat 3 | Ja   | 12        | 6    | 18    | 66,7% | -     |
|   | Nein | 3         | 30   | 33    | -     | 90,9% |
| Summe   |      | 15        | 36   | 51    | -     | -     |

Zusammenfassend zeigte die Suppression zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA um mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml nach 3-monatiger Therapie mit TDF oder LAM mit hoher Sensitivität und hoher Spezifität eine konsekutive HBeAg-Serokonversion an. Im direkten Vergleich der beiden HBV-RNA-Formen ergaben sich für die Kinetik der HBV-trRNA bessere statistische Gütekriterien. Insbesondere der negative Vorhersagewert sagte mit fast 91%-iger Wahrscheinlichkeit aus, dass ohne eine Reduktion der HBV-RNA  $\geq 1,0 \log_{10}$  Kopien/ml nach 3 Monaten antiviraler Behandlung eine nachfolgenden HBeAg-Serokonversion unwahrscheinlich ist.

#### 4.5.7 Vergleich der Kinetik der HBV-RNA unter der Therapie mit unterschiedlichen Nukleos(t)id-Analoga (TDF versus LAM)

Die Kinetik der HBV-DNA war bei Patienten mit LAM und bei Patienten mit TDF-Behandlung vergleichbar.

Die Rate des serologischen Ansprechens war bei Patienten mit LAM-Behandlung höher, was auf den Selektions-Bias zurückzuführen ist (Abschnitt 4.3.1). Demnach konnte bei 12 / 31 mit Lamivudin Behandelten (38,7%) eine HBeAg-Serokonversion nachgewiesen werden, wohingegen dies nur 7 / 48 Patienten, also 14,6%, unter Tenofovir auftrat.

Nach 9- bzw. 18-monatiger Therapie zeigten sich signifikant niedrigere Werte zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA in der Gruppe der Therapie mit LAM verglichen mit TDF (Abbildungen 35 und 36).

Hierbei war der höhere Anteil der Patienten mit konsekutiver HBeAg-Serokonversion in der LAM-Gruppe zu berücksichtigen, bei denen, wie oben gezeigt, die Konzentrationen der HBV-trRNA und -flRNA im Verlauf signifikant niedriger lagen.

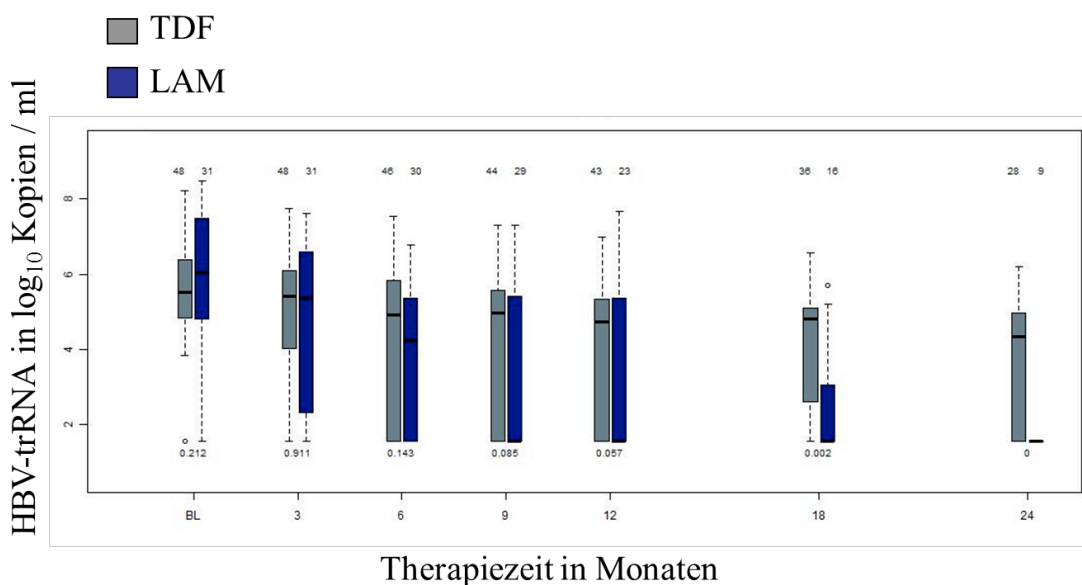


Abb. 35 Boxplots der HBV-trRNA im Verlauf vor Therapiebeginn und zu den Monaten 3, 6, 9, 12, 18, 24 nach Behandlungsbeginn. TDF 245 mg / d, n = 48, LAM 100 mg / d, n = 31.

## Ergebnisse

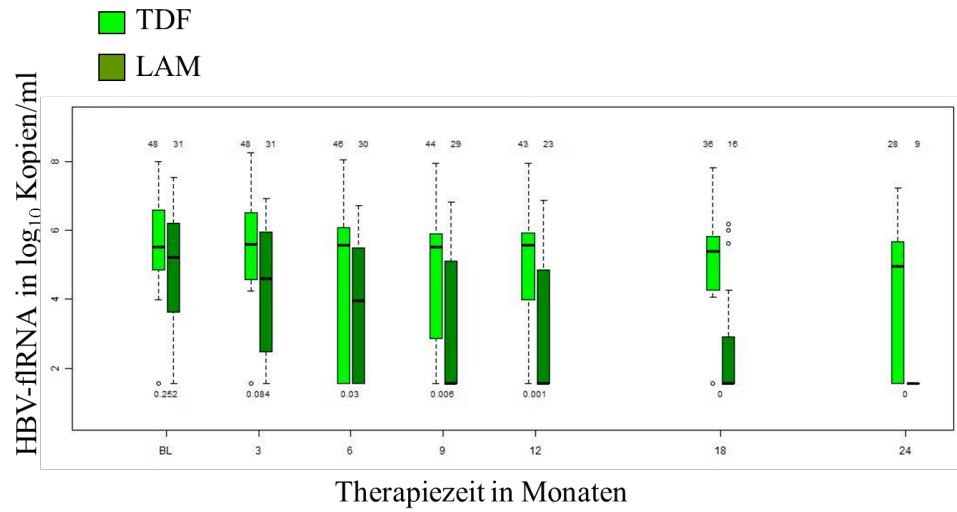


Abb. 36 Boxplots der HBV-fRNA im Verlauf vor Therapiebeginn und zu den Monaten 3, 6, 9, 12, 18, 24 nach Behandlungsbeginn. TDF 245 mg / d, n = 48, LAM 100 mg / d, n = 31.

## 5 Diskussion

### *5.1 Spezifischer Nachweis von polyadenylierter HBV-RNA im Serum*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von polyadenylierter HBV-RNA im Serum von Patienten sowohl mit HBeAg-positiver als auch mit HBeAg-negativer chronischer HBV-Infektion. Mittels quantitativer RT-qPCR auf der Basis einer RACE-PCR konnten wir einen RNA-spezifischen Assay zur Quantifizierung von HBV-RNA erstellen. Hierdurch ist unsere Methode einerseits spezifischer für den Nachweis von RNA als einige Methoden, die in anderen Arbeiten verwendet wurden; andererseits fallen Arbeitsschritte aus anderen Methoden weg, die einen Verlust von RNA und somit eine geringere Sensitivität des Nachweises bedingen. Die Vorteile unsere Arbeit werden deutlich, wenn man einen direkten Vergleich zu anderen bislang verwendeten Methoden zieht<sup>41,42,37,38,43</sup>.

- Hatakeyama et al., bestimmten indirekt die Gesamt-HBV-RNA-Konzentrationen im Serum, indem sie die Differenz aus der Konzentration des HBV-DNA-RNA-Gemisches und der HBV-DNA-Konzentration nach RNA-Verdau bildeten. Dazu wurde nach der Präparation der Nukleinsäuren einem Teil eine RNase zugesetzt, sodass die RNA abgebaut wurde. Anschließend erfolgte in beiden Ansätzen mittels Random Primern die Umschreibung und die Quantifizierung der HBV-DNA durch eine „in-house qPCR“<sup>41</sup>.
- Nach der Inkubation der Seren mit DNase führten Rokuhara et al. die reverse Transkription der HBV-RNA mit Hilfe von Random Primern durch, amplifizierten dann diese cDNA mittels S-Gen-spezifischer PCR und konnten auf diesem Wege RNA-Serumwerte bestimmen<sup>42</sup>. Trotz DNase-Verdau kann bei dieser Methode das Vorhandensein von Resten von HBV-DNA nicht ausgeschlossen werden.
- Zhang et al. und Su et al. führten zur Quantifizierung zirkulierender HBV-trRNA und HBV-flRNA optische Vergleiche der Signale in Southern Blots durch. Die Skalierung erfolgte entweder mit Markern bekannter Konzentrationen oder durch kategoriale Einteilung von nicht nachweisbar (0) bis hohe Konzentrationen (+3)<sup>37,43</sup>. Die Genauigkeit dieser Methode ist nicht mit einer RT-qPCR vergleichbar.
- Huang und Mitarbeiter quantifizierten HBV-RNA ebenfalls indem sie die Differenz des HBV-DNA-RNA-Gemisches und der HBV-DNA-Konzentration bildeten. Dazu erfolgte nach Nukleinsäurepräparation die reverser Transkription mit Random-Primern und anschließend die Quantifizierung (der HBV-DNA und HBV-cDNA) mittels etablierter RT-qPCR unter Verwendung von SYBR Green. Davon wurde die Konzentration der

## Diskussion

HBV-DNA, gemessen mittels gleicher RT-qPCR aber ohne reverse Transkription, subtrahiert<sup>40</sup>. Sie erhielten untere Nachweisgrenzen von  $10^3$  Kopien / mL.

Unsere Methode weist verschiedene andere Vorzüge auf:

Durch die Verwendung von spezifischen Primern für die reverse Transkription der HBV-trRNA und HBV-flRNA wurden diese spezifisch umgeschrieben. Ähnliche Primer wurden schon von Hilger et al, 1991 und Su et al, 2001, veröffentlicht<sup>44,54</sup>. In unseren Untersuchungen zeigten sich hier zudem auch unspezifische Hybridisierungen (Abschnitt 4.2.3), sodass wir die Sequenz des Primers zur Umschreibung der HBV-trRNA modifizierten (PxT2tr zu PxT3tr). Somit wurde eine Bindung des Primers PxT3tr an HBV-flRNA ausgeschlossen und die Spezifität der Nachweismethode erhöht.

Der Einsatz von spezifischen Primern und TaqMan-Sonden in der RT-qPCR erhöhte wiederum die analytische Spezifität. TaqMan-Sonden sind mit einem Reporter und Quencher versehen. Sie binden eine bestimmte Nukleotidfolge. Kommt es während der PCR zur Abspaltung von Fragmenten der Sonde und somit zur räumlichen Trennung des Reporters und Quenchers, wird ein messbares Fluoreszenzsignal generiert. Im Vergleich dazu hybridisieren andere DNA-Farbstoffen, wie z.B. SYBR Green, unspezifisch, sodass ein Fluoreszenzsignal auch bei Bildung von unbestimmten PCR-Produkten und Primer-Dimeren entstehen kann<sup>58,59</sup>.

Zudem wurden falsch-negative Ergebnisse oder Fehler der Real-time-PCR minimiert, indem IC (internen Kontrollen) jedem Reaktionsansatz vor Isolierung der Nukleinsäuren zugegeben wurden<sup>57</sup>.

Außerdem dienten Negativkontrollen bei jeder RT und qPCR zum Nachweis von eventuellen Verunreinigungen zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse.

Bezüglich der analytischen Sensitivität der beiden PCRs wurden lineare Messbereiche der HBV-trRNA von 600 bis  $10^6$  Kopien / mL und der HBV-flRNA von 450 bis  $10^6$  Kopien / mL ermittelt. Auch niedrigere Serumkonzentrationen wurden registriert, eine Quantifizierung war außerhalb des linearen Bereiches nicht möglich.

In der Arbeit von Huang und Mitarbeitern wurde HBV-RNA durch Subtraktion der HBV-DNA vom HBV-DNA-cDNA-Gemisch bestimmt und die untere Nachweisgrenze lag bei  $10^3$  Kopien / mL<sup>40</sup>. Die bessere untere Nachweisgrenze unserer Methodik ist auch auf die höhere Spezifität durch alleinige Amplifikation der HBV-cDNAs und die geringe Anzahl der Reaktionsschritte und damit Fehlermöglichkeiten, wie beschrieben, zurückzuführen.

### 5.1.1 Annahmen zur Herkunft der HBV-trRNA

Mit unserem Assay wiesen wir sowohl ein HBV-RNA –Fragment nach, welches über ein vollständiges 3'-Ende verfügt als auch ein Fragment, welches eine Trunkierung Richtung 5'-Ende besitzt. Ein Verlust von Sequenzen des 3'-Endes beeinflusst die Proteinsynthese nicht negativ, da die Translation der Proteine am 5'-Ende beginnt. Demnach ist auch bei Verlust von HBV-DNA im Rahmen der Genomintegration durch Aktivierung des funktionellen Polyadenylierungssignals CATAAA eine Proteinbiosynthese gewährleistet.

Die am 3'-Ende trunkierten HBV-RNA-Form (trRNA) wurde in anderen Studien untersucht.

So postulierten Schutz et al., dass das CATAAA-Motiv als Polyadenylierungssignal aktiviert wird, entweder wenn das „eigentliche“ Polyadenylierungssignal TATAAA inaktiviert ist oder es zum Verlust des Signals TATAAA, z.B. durch chromosomale Integration der HBV-DNA ins menschliche Genom, käme<sup>35</sup>.

Da das HBV-trRNA-Fragment möglicherweise eine Assoziation mit Response auf antivirale Behandlung zeigt, wurde es in unserer Studie mituntersucht. Die Annahme, dass die HBV-trRNA durch fehlerhafte Transkription entsteht und folglich als funktionsloses Nebenprodukt im Blut zirkuliert, gerät nach unseren Ergebnissen, die eine stärkere Suppression unter Hemmung der viralen Transkriptase aufweisen, eher in den Hintergrund. Vielmehr scheint es, als spiele die HBV-trRNA eine Rolle bei der Virusreplikation. Einen weiteren Hinweis darauf liefert die stärkere Korrelation der HBV-DNA mit der HBV-trRNA ( $r = 0,71$ ) im Vergleich zur HBV-flRNA ( $r = 0,64$ ). Die Werte zirkulierender HBV-DNA nahmen unter effektiver Hemmung der Virusreplikation durch TDF oder LAM erwartungsgemäß stark ab, sodass die auch starke Suppression der HBV-trRNA damit im Zusammenhang stehen könnte. Zur Beantwortung der Frage der Herkunft und der biologischen Funktion der polyadenylierten HBV-trRNA im Serum sind aber weitere Untersuchungen notwendig.

### 5.1.2 Annahmen zur Konformation der polyadenylierten HBV-RNA im Serum

Nukleos(t)id-Analoga wie TDF und LAM hemmen die reverse Transkriptase des Virus, sodass der Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus unterbrochen wird und somit die DNA-Synthese abnimmt. Die Therapeutika haben jedoch keinen bekannten Einfluss auf die Transkription von HBV-RNA und Translation. Das erklärt die Nachweisbarkeit von HBV-RNA und Virusproteinen im Serum auch unter medikamentös supprimierter Virusreplikation.

Fragen, die bisher nicht vollständig geklärt wurden:

1. Wie gelangt polyadenylierte RNA ins Serum, sodass sie z.T. in hohen Konzentrationen nachweisbar war?

2. Unter welchen Bedingungen wird das zusätzliche Polyadenylierungssignal CATAAA innerhalb des X-ORF, erstmals beschrieben von Hilger et al., 1991, aktiviert?

Köck et al. fanden es denkbar, dass auch „unfertige“ Virione entstehen, indem Nukleokapside auch ohne reverse Transkription der pgRNA aus der Wirtszelle ausgeschleust werden<sup>36</sup>. Die pgRNA wird meist erst nach der Zusammenlagerung des Nukleokapsids revers transkribiert, allerdings findet die Ausschleusung aus der Zelle erst nach der reversen Transkription statt. Bei jeder Virusinfektion entstünden allerdings auch ein gewisser Anteil defekter Viruspartikel bei mangelhafter Replikation<sup>36</sup>. Unter Annahme der Hypothese der Sekretion der HBV-RNA als „unfertige“ Virione, könnte man vermuten, dass eine effektive Hemmung der reversen Transkriptase auch, auf bisher unbekanntem Wege, die Sekretion der unreifen Nukleokapside mit pgRNAs in Hüllproteine verpackt ins Blut verhindert.

In einer Arbeit von Su et al. wurden unter anderem 168 Patienten mit chronischer HBV-Infektion zu Therapiebeginn mit Lamivudin untersucht. Dabei wurde in 90% der Seren HBV-RNA nachgewiesen (trRNA zu 89,9% und flRNA zu 88,6%). Sie postulierten, dass zirkulierende HBV-RNA nicht in Nukleokapside verpackt sei, da die Abgabe der Nukleokapside erst nach der DNA-Minusstrangsynthese und der Hydrolyse der RNA erfolge, wie Arbeiten von Gerelsaikhon et al. zeigen<sup>60</sup>.

Vielmehr vermuteten sie, dass HBV-RNA frei oder nach Abschnürung von Hepatozyten nur mit einer Plasmalipidmembran umhüllt und geschützt im Serum vorliegen, da HBV-RNA auch in Abwesenheit von Replikationsmarker messbar waren.

Zhang et al. beschrieben HBV-RNA mit teilweise revers transkribiertem DNA-Minusstrang und schlussfolgerten ebenso, dass die HBV-RNA in Nukleokapsiden im Serum vorliege. Als Menge zirkulierender HBV-RNA ermittelten sie nur 1% der HBV-Virione<sup>39</sup>.

Ferner formulierten Zhang et al. die Hypothese, dass HBV-RNA durch Zerstörung der Hepatozyten ins Blutsystem gelange und so nachweisbar sei.

In dieser vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine nur niedrige Korrelation sowohl der HBV-trRNA als auch der HBV-flRNA mit der ALT (Alanintransaminase) als Markerenzym der Leberzellzerstörung gezeigt (Tabelle 41). Eine Freisetzung der HBV-RNA ins Blut durch Zelluntergang der Hepatozyten ist denkbar, aber ist offensichtlich nicht der einzige Prozess.

Rokuhara et al. wiederum untersuchten S-Gen-spezifische RNA nach Abbau der Virus-DNA mittels DNase im Serum<sup>42</sup>. Die Konzentrationen der HBV-RNA im Serum entsprachen 1 / 20 bis 1 / 10 der Menge an HBV-DNA. Ihre Analysen der Dichtegradienten der Virusparameter im Serum zeigte ähnliche Peaks für die DNA, HBcAg und RNA, sodass die Interpretation nahe lag, dass die HBV-RNA ebenfalls in Nukleokapside verpackt im Serum vorläge.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch nach langer Lagerung der Seren teilweise in hohen Konzentrationen HBV-RNA nachgewiesen, was die These stützt, dass diese vor der Aktivität von RNAsen geschützt und nicht frei im Serum vorliegen.

In der Zusammenschau der bisher veröffentlichten Arbeiten scheint die Zirkulation der HBV-RNA in Nukleokapsiden am wahrscheinlichsten, allerdings sollte das noch in zukünftigen Untersuchungen erforscht werden.

### ***5.2 Prädiktion von serologischer Response anhand von polyadenylierter HBV-RNA im Serum***

#### **5.2.1 Eigenschaften unseres Patientenkollektivs**

Die bislang veröffentlichten Arbeiten untersuchten HBV-RNA im Serum entweder an einer geringen Anzahl von Patienten über einen längeren Zeitraum oder jeweils nur zu einem Zeitpunkt<sup>41,42,37,38,43</sup>. Die Assoziation von HBV-RNA mit therapeutischen Endpunkten wurde bislang nicht untersucht. Daher planten wir eine retrospektive Untersuchung und Messungen der HBV-RNA in einem gut charakterisierten Kollektiv von Patienten, die unter Langzeit-Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga waren und von denen entsprechende Serumproben vorhanden waren.

Ursprünglich sollte nur ein Kollektiv unter der Therapie mit TDF untersucht werden. Auf der Grundlage der ersten Ergebnisse und der hier bereits beobachteten Assoziation von Rückgang der HBV-RNA und HBeAg-Serokonversion wurde das Kollektiv um Patienten unter Therapie mit LAM erweitert. Hierbei wurden nur Patienten eingeschlossen, die eine vergleichbare virologische Response (Rückgang der HBV-DNA) unter Therapie mit LAM zeigten wie die Patienten in der TDF-Gruppe. Außerdem wurden hauptsächlich Patienten mit bekannter HBeAg-Serokonversion unter Therapie in das Kollektiv aufgenommen, um einen statistisch valideren Vergleich anstellen zu können.

Nach Ausschluss weiterer Kriterien (Abschnitt 4.3.3.1) wurde die Analyse der Kinetik der HBV-trRNA und -flRNA an einem Kollektiv von 62 Patienten durchgeführt. Damit resultierte für die Gruppe der HBeAg-positiven mit konsekutiver HBeAg-Serokonversion eine Gruppenstärke von 15 Patienten. Das ist eine eher geringe Anzahl und es erklärt die teilweise hohen Standardabweichungen in den Berechnungen.

#### **5.2.2 Polyadenylierte HBV-RNA im Serum vor Therapiebeginn**

Wir zeigten eine starke Korrelation zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA untereinander ( $r = 0,75$ ), auch wenn die Konzentrationen der HBV-trRNA im Mittel 3,5-fach höher als die der HBV-flRNA waren.



## Diskussion

Zhang et al. sowie Hacker et al. bestimmten bei 1 bzw. 2 Patienten HBV-trRNA und -flRNA mit anderen Nachweismethoden<sup>38,39</sup>. Sie wiesen ebenfalls bei diesen 3 Patienten ebenfalls hohe Serumkonzentrationen sowohl der HBV-trRNA als auch der HBV-flRNA nach.

Unterschiede der beiden Formen zeigten sie bei Patienten ohne antivirale Behandlung ebenfalls nicht.

Rokuhara et al. untersuchten in ihrer Arbeit S-Gen-spezifische HBV-RNA im Serum von Patienten mit chronischer HBV-Infektion und zeigten vor Beginn einer antiviralen Therapie erwartungsgemäß eine starke Korrelation der HBV-RNA mit der HBV-DNA mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,80$ .

Auch in unseren Messungen korrelierten zu Therapiebeginn die HBV-RNA-Formen stark mit der Höhe der HBV-DNA, wie in den Abbildungen 23 und 24 dargestellt ( $r = 0,71$  und  $r = 0,64$ ).

Su et al. hingegen, die u.a. auch Patienten mit chronischer HBV-Infektion (ohne antivirale Therapie) untersuchten, beschrieben eine starke Korrelation der HBV-flRNA mit der HBV-DNA ( $r = 0,79$ ) bei nur schwacher Korrelation der HBV-trRNA und HBV-DNA im Serum ( $r = 0,14$ ). Weiterhin zeigten sie Korrelationen der HBV-flRNA mit positiven HBeAg und mit der Höhe der Serumkonzentration von ALT. Sie beobachteten weiterhin eine altersabhängige Abnahme der zirkulierenden HBV-flRNA.

In unserem Kollektiv zeigte sich allerdings weder eine Abhängigkeit vom Alter der Patienten, noch eine Korrelation mit ALT-Konzentrationen.

Da eine HBV-Infektion nicht zwangsläufig zur Immun- / Entzündungsreaktion führen muss, die zur Zerstörung der Hepatozyten führt, finden sich auch nicht bei jedem Patienten erhöhte Transaminasen im Serum, ohne dass das etwas über die Replikation des Virus aussagt<sup>27</sup>.

Bezüglich HBsAg-Serumkonzentrationen stellten wir lediglich schwache Korrelationen mit zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA dar ( $r = 0,29 - 0,30$ ).

Ferner fanden wir keinen Zusammenhang zirkulierender HBV-trRNA oder -flRNA mit dem HBV-Genotyp oder Geschlecht. Anzumerken ist hierbei, dass der Großteil der Patienten (54,4%) mit dem Genotyp D des Hepatitis-B-Virus infiziert war und aufgrund der geringen Patientenzahl eine valide Untersuchung der Assoziation von HBV-RNA und den HBV-Genotypen nicht möglich war.

Ursachen für diese Unterschiede könnten zum einen auch in der Auswahl des Patientenkollektivs liegen. Su et al. berücksichtigten in den Berechnungen sowohl Werte der HBsAg-positiven und HBsAg-negativen Patienten als auch der Patienten mit HCC auf dem Boden einer chronischen HBV-Infektion<sup>37</sup>. Zudem erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der HBV-DNA und –

RNA-Konzentrationen durch optischen Vergleich in die Kategorien von +1 bis +3. Diese Kategorisierung könnte zur Verschiebung der Korrelationskoeffizienten geführt haben.

### **5.2.3 HBV-RNA im Serum bei HBeAg-negativen Patienten vor Therapie**

Eine europäischen Studie von Jaroszewicz et al. zeigte, dass HBeAg-negative Patienten sowohl niedrigere HBV-DNA- als auch HBsAg-Level im Vergleich zu Patienten mit chronischer HBV-Infektion und positivem HBeAg-Status haben<sup>61</sup>. Trotz möglicher Fluktuationen sind die HBV-DNA und ALT-Werte im Mittel geringer<sup>62</sup>.

In unseren Untersuchungen wiesen die HBeAg-negativen Patienten erwartungsgemäß nicht nur niedrigere Serumkonzentrationen der HBV-DNA, der ALT und des HBsAg als HBeAg-positive Patienten auf. Interessanterweise zeigten sie auch niedriger Konzentrationen zirkulierender HBV-trRNA und -flRNA (Tabelle 38).

Su et al. wiesen ebenfalls geringere Konzentrationen der HBV-trRNA und -flRNA bei HBeAg-negativen Patienten nach<sup>37</sup>.

### **5.2.4 HBV-RNA im Serum unter Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga**

In unserem Kollektiv kam es bereits nach 3-monatiger antiviraler Behandlung zu einer starken Rückgang der mittleren HBV-RNA-Konzentrationen im Serum. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Arbeit von Hacker et al., in welcher Seren eines Patienten vor und während der Behandlung mit LAM untersucht und in welcher gezeigt wurde, dass durch die medikamentöse Hemmung der reversen Transkriptase die HBV-DNA erwartungsgemäß supprimiert wurde; die zirkulierenden HBV-trRNA und -flRNA aber weiterhin in hohen Konzentrationen nachweisbar waren<sup>38</sup>. Rokuhara et al. bestimmten auch HBV-RNA im Serum vor und nach 2 und 6 Monaten nach Beginn der LAM-Therapie bei 24 Patienten. Sie zeigten ebenfalls den zeitlich verzögerten Abfall zirkulierender HBV-RNA im Vergleich zur HBV-DNA<sup>38</sup>.

In unserer Kohorte war bereits nach 3 Monaten Therapie mit TDF oder LAM ein drastischer Abfall der HBV-trRNA und -flRNA bei den HBeAg-positiven Patienten mit konsekutiver HBeAg-Serokonversion zu verzeichnen (Tabelle 38: Gruppe 1 und 2, Abbildungen 26 und 27). Diese Reduktion war unabhängig von anderen Virusparametern wie HBV-DNA, HBsAg oder HBV-Genotyp, von den ALT-Werten oder dem Alter bzw. Geschlecht der Patienten. Die Zeitspannen zwischen den Ereignissen der Suppression der HBV-trRNA und -flRNA unter die jeweiligen Nachweisgrenzen und dem Verlust des HBeAg betrug bis zu 50 Monaten und lag im Mittel bei 15 Monaten (Tabelle 41). Der Rückgang der HBV-RNA im Serum war ein stärkerer Prädiktor für eine folgende HBeAg-Serokonversion als ein Rückgang von HBV-DNA oder HBsAg oder als die Baselinecharakteristika der Patienten.

## Diskussion

Gemäß unserer Untersuchungen war vor allem die Suppression der der HBV-flRNA und etwas stärker die Suppression der HBV-trRNA von mehr als  $1,0 \log_{10}$  Kopien / ml nach 3-monatiger Therapie sehr spezifisch und sensitiv hinsichtlich der Prädiktion einer HBeAg-Serokonversion (Abbildung 30, Tabellen 42 - 44). Insbesondere der hohe negative prädiktive Wert von 90,9% (Tabelle 44) bei dieser vergleichsweise geringen Reduktion der zirkulierenden HBV-trRNA belegt die hohe prognostische Bedeutung.

Im Gegensatz dazu kam es bei HBeAg-positiven Patienten, deren HBeAg im Beobachtungszeitraum stets nachweisbar war, nur zu einer geringen Abnahme der zirkulierenden HBV-trRNA und -flRNA. Im Mittel waren beide HBV-RNA-Formen in hohen Konzentrationen nach 3-monatiger Therapie und auch im weiteren Verlauf nachweisbar. Jedoch konnte eine spätere HBeAg-Serokonversion bei diesen Patienten außerhalb unseres Beobachtungszeitraums nicht ausgeschlossen werden<sup>63</sup>.

Ein signifikanter Unterschied der DNA-Suppression hingegen war bei HBeAg-positiven Patienten mit und ohne nachfolgende HBeAg-Serokonversion erst nach 6-monatiger Therapie ersichtlich (Abbildung 28). Diese war verglichen mit dem Abfall der HBV-trRNA und der -flRNA weniger stark ausgeprägt (Abbildung 34, multivariate Analyse).

In unseren Auswertungen zeigte sich nach 3- und 6-monatiger antiviraler Therapie kein signifikanter Unterschied des zirkulierenden HBsAg hinsichtlich einer folgenden HBeAg-Serokonversion bei HBeAg-positiven Patienten (Tabelle 38). Dies legt die Vermutung nahe, dass die intrahepatische cccDNA nicht reduziert wird bei Patienten, die einen Abfall der HBV-RNA zeigen. Auch im weiteren Verlauf lagen die HBsAg-Spiegel bei Respondern und Non-Respondern in vergleichbaren Bereichen (Abbildung 29). Es war maximal eine leichte Suppression des HBsAg nach 24-monatiger antiviraler Behandlung zu erkennen.

Somit ist der Mechanismus der Suppression der zirkulierenden HBV-RNA weiterhin unklar, wie auch der Zusammenhang der Suppression der HBV-RNA mit dem immunologischen Ereignis der HBeAg-Serokonversion. Wahrscheinlich spielen auch wirtseigene genetische Voraussetzungen eine Rolle bei der immunologischen Kontrolle der HBV-Infektion. In der Arbeit von Wu et al. konnte kürzlich gezeigt werden, dass Polymorphismen im Bereich der Gene der Toll-like-Rezeptoren eine Rolle bei der HBeAg-Serokonversion spielen<sup>64</sup>. Der Zusammenhang zwischen der Suppression der HBV-Replikation, einem nachfolgenden serologischen Ansprechen und genetischen Eigenschaften des Wirts sollte in größeren Kollektiven untersucht werden.

### ***5.3 Ausblick: Weitere Responsemarker der HBV-Behandlung und weitere Studien zur HBV-RNA im Serum***

Sung et al. verwiesen auf intrahepatische cccDNA als prädiktiven Marker bezüglich des anhaltenden Therapieansprechens<sup>63</sup>. Am Ende der Therapie mit LAM und z.T. Peginterferon waren die Konzentrationen der intrahepatischen HBV-DNA und cccDNA signifikant niedriger bei den Patienten mit anhaltender virologischer Kontrolle. Zur Bestimmung der intrazellulären cccDNA ist eine Leberbiopsie erforderlich. Dies ist ein risikobehafteter Eingriff. Im klinischen Alltag ist die cccDNA daher zum Therapiemonitoring der chronischen HBV-Infektion eher ungeeignet. Ein (noch zu entwickelnder) Test zum Nachweis von HBV-cccDNA im Serum könnte aber zur Prädiktion von Krankheitsverlauf und Ansprechen auf Behandlung hilfreich sein. HBsAg-Level im Serum geben wahrscheinlich die Aktivität der Transkription der cccDNA wieder, weniger die absolute intrahepatische Konzentration der HBV-DNA<sup>66</sup>. Einige Untersuchungen zeigten bisher z.T. starke Korrelationen der HBsAg-Konzentrationen im Serum mit der cccDNA und zum Teil auch intrahepatischen DNA-Konzentration bei fehlender Korrelation zur zirkulierenden HBV-DNA<sup>67-71</sup>. Unter der antiviralen Therapie ist teilweise auch ein Abfall der HBsAg-Konzentration im Serum zu verzeichnen. Weiterhin fehlen allerdings genaue Untersuchungen zur Höhe der HBsAg-Reduktion unter Therapie oder auch Cut-off-Werte (Grenzwerte) der Serumkonzentration, die eine effektive immunologische Kontrolle der Virusinfektion vorhersagen. Ob HBsAg-Konzentrationen auch für zukünftige Therapiekonzepte oder Auslassversuche eine Prädiktion des Ansprechens erlauben, muss noch geprüft werden. Die Bedeutung der zirkulierenden HBV-trRNA und HBV-flRNA zum Therapiemonitoring HBeAg-positiver sowie HBeAg-negativer Patienten sollte an größeren Fallzahlen überprüft werden, und auch für andere Therapien (z.B. pegyliertes Interferon-alpha-2a) untersucht werden. Auch die Prädiktion des Endpunkts HBsAg-Serokonversion/ HBsAg-Verlust sollte untersucht werden, da auf Grundlage der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Fallzahl keine allgemeingültigen Aussagen darüber getroffen werden können. Hierzu wären Serumproben aus großen, kontrollierten Studien am besten geeignet. Die biologische Funktion der HBV-RNA im Serum (trRNA und flRNA) ist bislang unklar und sollte im Zellkultursystem untersucht werden. Möglicherweise ergeben sich durch solche Untersuchungen Hinweise auf therapeutische Targets für neue, wirksamere Therapien der HBV-Infektion.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organization (WHO). Hepatitis B 2008.
- 2 Robert Koch-Institut. Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2009. *Epidemiologisches Bulletin* 2010; 20: 177–190.
- 3 Herold G. Virushepatitiden. In: Herold G. *Innere Medizin* 2015. 2014; 520 – 537.
- 4 Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Sarrazin C, Dollinger MM, Schirmacher P, Dathe K, Kopp IB, Zeuzem S, Gerlich WH, Manns MP, AWMF. Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 871–930.
- 5 Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ; the REVEAL-HBV-Study Group. Predicting Cirrhosis Risk Based on the Level of Circulating Hepatitis B Viral Load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678–686.
- 6 Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J. Hepatol* 2010; 52: 282–284.
- 7 Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am. J. Gastroenterol* 2006; 101: 1797–1803.
- 8 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 51–68.
- 9 Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnus L. O. 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* 1992; 73: 1201–1208.
- 10 Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695–698.
- 11 Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir. Ther. Lond.* 2004; 9: 149–160.
- 12 Summers J, O’Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 4597–4601.
- 13 Seeger C, Zoulim F, Mason WS. in David M. Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, und Robert A. Lamb: *Lippincott Williams and Wilkins Fields Virology* 2006; 2: 2977 – 3029.

## Literatur

- 14 Hilger C, Velhagen I, Zentgraf H, Schröder CH. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA. *J. Virol* 1991; 65: 4284–4291.
- 15 Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B Virus X Protein Stimulates Viral Genome Replication via a DDB1-Dependent Pathway Distinct from That Leading to Cell Death. *J. Virol.* 2005; 79: 4238–4245.
- 16 Motavaf M, Safari S, Saffari Jourshari M, Alavian SM. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein. *Acta Virol.* 2013; 57: 389–396.
- 17 Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008; 134: 235–249.
- 18 Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2009; 51: 581–592.
- 19 Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N. & Schaller, H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 1983; 305: 336–338.
- 20 Simonsen CC, Levinson AD. Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. Cell. Biol.* 1983; 3: 2250–2258.
- 21 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 651–693.
- 22 Ryu DK, Ahn BY, Ryu WS. Proximity between the cap and 5' epsilon stem-loop structure is critical for the suppression of pgRNA translation by the hepatitis B viral polymerase. *Virology* 2010; 406: 56–64.
- 23 Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A. Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect* 2001; 14: 325–334.
- 24 Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 215–229.
- 25 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439–1449.
- 26 Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M. IFN- $\alpha$  inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest* 2012; 122: 529–537.
- 27 Baumert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol* 2007; 13: 82–90.

## Literatur

- 28 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 29–60:
- 29 Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, Gatta A. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmunity Reviews* 2008; 8: 13–17.
- 30 Brechot C, Dejean A, Tiollais P. Hepatitis B viral DNA sequences in the infected tissues. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1983; 143: 345–356.
- 31 Romet-Lemonne JL, Elfassi E, Haseltine W, Essex M. Infection of bone marrow cells by hepatitis B virus. *The Lancet* 1983; 322: 732.
- 32 Burczynska B, Madalinski K, Pawlowska J, Woynarowski M, Socha J, Gerlich WH, Willems WR, Wozniewicz B, Stachowski J. The value of quantitative measurement of HBeAg and HBsAg before interferon-alpha treatment of chronic hepatitis B in children. *J. Hepatol* 1994; 21: 1097–1102.
- 33 Milich DR, Schödel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol* 1997; 71: 2192–2201.
- 34 Vernazza, P. Hepatitis B: eine lesenswerte Übersicht. <http://infekt.ch/2004/03/hepatitis-b-eine-lesenswerte-uebersicht/> [Stand: 10.12.2014, 13:27]
- 35 Schutz T, Kairat A, Schröder CH. DNA sequence requirements for the activation of a CATAAA polyadenylation signal within the hepatitis B virus X reading frame: rapid detection of truncated transcripts. *Virology* 1996; 223: 401–405.
- 36 Köck J, Theilmann L, Galle, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996; 23: 405–413.
- 37 Su Q, Wang SF, Chang TE, Breitzkreutz R, Hennig H, Takegoshi K, Edler L, Schröder CH. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin. Cancer Res* 2011; 7: 2005–2015.
- 38 Hacker HJ, Zhang W, Tokus M, Bock T, Schröder CH. Patterns of circulating hepatitis B virus serum nucleic acids during lamivudine therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2004; 1022: 271–281.
- 39 Zhang W, Hacker HJ, Mildemberger M, Su Q, Schröder CH. Detection of HBV RNA in serum of patients. *Methods Mol. Med* 2004; 95: 29–40.

- 40 Huang YW, Chayama K, Tsuge M, Takahashi S, Hatakeyama T, Abe H, Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen DS, Yang SS, Kao JH. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B. *Antivir. Ther. (Lond.)* 2010; 15: 177–184.
- 41 Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007; 45: 1179–1186.
- 42 Rokuhara, Matsumoto A, Tanaka E, Umemura T, Yoshizawa K, Kimura T, Maki N, Kiyosawa K. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. *J. Gastroenterol* 2006; 41: 785–790.
- 43 Zhang W, Li YH, Zhu SJ, Zhang Y, Gong L, Wang SM, Hacker HJ, Schröder CH, Cheng DS, Feng YM. Hepatitis B virus X-DNA. A serum marker for early detection of resistance development during lamivudine therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2008; 1137: 264–272.
- 44 Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weilert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Washington MK, Sorbel J, Anderson J, Snow-Lampart A, Mondou E, Quinn J, Rousseau F. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 2442–2455.
- 45 Marcellin P. Seven years of treatment with tenofovir DF for chronic hepatitis B virus infection is safe and well tolerated and associated with sustained virological, biochemical, and serological responses with no detectable resistance [abstract]. *Hepatology* 2013; 649A.
- 46 Janssen HLA, Sonneveld MJ, Brunetto MR. Quantification of serum hepatitis B surface antigen: is it useful for the management of chronic hepatitis B? *Gut* 2012; 61: 641–645.
- 47 Lok ASF, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714–1722.
- 48 Dakin H, Fidler C, Harper C. Mixed treatment comparison meta-analysis evaluating the relative efficacy of nucleos(t)ides for treatment of nucleos(t)ide-naïve patients with chronic hepatitis B. *Value Health* 2010; 13: 934–945.



## Literatur

- 49 Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1991; 88: 8495–8499.
- 50 Hu, G. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol* 1993; 12: 763–770.
- 51 Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85, 8998–9002.
- 52 Yao JDC, Beld MG, Oon LL, Sherlock CH, Germer J, Menting S, Se Thoe SY, Merrick L, Ziermann R, Surtihadi J, Hnatyszyn HJ. Multicenter Evaluation of the VERSANT Hepatitis B Virus DNA 3.0 Assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 800–806.
- 53 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; 74: 5463–5467.
- 54 Zou H, Hastie T. Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. *JRSSB* 2005; 301–320.
- 55 Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: D36–42.
- 56 Van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, Edelmann A. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* (2014).
- 57 Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadaro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36: 191–197.
- 58 Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1988; 85: 8790–8794.
- 59 Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997; 22: 130–131, 134–138.
- 60 Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V. Hepatitis B Virus Nucleocapsid Envelopment Does Not Occur Without Genomic DNA Synthesis. *J. Virol.* 1996; 70: 4269–4274.

- 61 Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, Flisiak R, Bock CT, Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J. Hepatol.* 2010; 52: 514–522.
- 62 Sonneveld MJ, Zoutendijk R, Janssen HLA. Hepatitis B surface antigen monitoring and management of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.* 2011; 18: 449–457.
- 63 Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weilert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Gurel S, Snow-Lampart A, Borroto-Esoda K, Mondou E, Anderson J, Sorbel J, Rousseau F. Three-Year Efficacy and Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate Treatment for Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2001; 140: 132–143.
- 64 Wu JF, Chen CH, Ni, Lin YT, Chen HL, Hsu HY, Chang MH. Toll-like receptor and hepatitis B virus clearance in chronic infected patients: a long-term prospective cohort study in Taiwan. *J. Infect. Dis.* 2012; 206: 662–668.
- 65 Sung JJY, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology* 2005; 128: 1890–1897.
- 66 Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, Wong GL, Sung JJ. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 5: 1462–1468.
- 67 Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, Tillmann HL, Kao JH, Jia JD, Wedemeyer H, Locarnini S, Janssen HL, Marcellin P. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J. Hepatol.* 2011; 55: 1121–1131.
- 68 Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, Ayres A, Jackson K, Littlejohn M, Slavin J, Bowden S, Gane EJ, Abbott W, Lau GK, Lewin SR, Visvanathan K, Desmond PV, Locarnini SA. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* 2010; 51: 1933–1944.
- 69 Li WJ, Li BA, Zhao JM, Han JQ, Liu Y, Jiang L, Mao YL, Lu FM, Xu DP. Quantitative analyses of intrahepatic HBV cccDNA and serum HBsAg in 54 patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2011; 19: 815–817.

## Literatur

- 70 Zhang L, Wu F, Shi L, Dou X. Quantitative analysis of HBV cccDNA from liver biopsy specimens in HBV carriers: correlation with serological makers and sera HBV DNA. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2011; 25: 112–113.
- 71 Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CAB, Hansen BE, Janssen HLA. Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010; 52: 1251–1257.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Anne Bartens, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Quantifizierung von polyadenylierter RNA des Hepatitis-B-Virus im Serum als prognostischer Marker für das Ansprechen auf eine Behandlung mit reversen Transkriptasehemmern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Erklärung

### **Anteilserklärung an erfolgter Publikation**

Frau Anne Bartens hatte folgenden Anteil an den folgender Publikation:

van Bömmel F\*, Bartens A\*, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, Edelmann A.  
Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. Hepatology. 2014 Aug 18.

\* Geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen:

Etablierung der Methodik, Messung der HBV-RNA-Konzentrationen in Patientenseren,  
Auswertung der Ergebnisse

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Thomas Berg für die Überlassung des spannenden Themas, für die konstruktiven Diskussionen und wertvollen Empfehlungen.

Herrn Prof. Jörg Hofmann und Herrn Prof. Detlev H. Krüger danke ich für die Bereitstellung der guten Arbeitsbedingungen und Förderungen zur Durchführung der Arbeit.

Ich spreche großen Dank für Frau Dr. Anke Edelmann aus, die mir vor allem bei der praktischen Einarbeitung und Methodenentwicklung mit Geduld jederzeit zur Verfügung stand, sodass ich sehr viel lernte. Der kollegiale, freundschaftliche Austausch, welchen ich in der gemeinsamen Zeit erfahren durfte, war von großem Wert.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Florian van Bömmel in erster Linie für die Idee und Konzeption des Projekts. Im Besonderen danke ich ihm für seine hilfreichen Ideen und Tipps, die konstruktive Kritik und vor allem den fortwährend freundlichen Zuspruch, womit er mich die gesamte Zeit unterstützte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Alena Mysickova für die gute Unterstützung der statistischen Auswertung und der Erstellung von Abbildungen.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Barbara Malik für die stets freundliche Unterstützung in der Organisation der Proben und Daten.

Frau Annika Brodzinski und Herr Balazs Fülöp danke ich für das Sammeln der Blutproben und Herrn Heinz-Hubert Feucht für die Unterstützung bei der HBV-Genotypisierung. Ebenso gilt mein Dank Frau Karin Hensel-Wiegel für die Messung der HBsAg-Konzentrationen.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Virologie, die mir immer hilfsbereit bei Fragen und Problemen begegneten.

Diese Arbeit wurde zudem von Abbott Diagnostics GmbH durch die Bereitstellung von Antikörpern und Reagenzien zur HBsAg-Quantifizierung unterstützt.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer, sehr großer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir jederzeit mit Rat und Motivation zur Seite standen.

