

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institutsdirektor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

**Reverse Transkription des gesamten
Hepatitis-C-Virus-Genoms unabhängig vom
Genotyp zur kombinierten Genotypisierung
und Resistenztestung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Matthias Bergmann

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Jörg Timm

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Birgit Henrich

„If your dreams do not scare you, they are not big enough.”

– Ellen Johnson Sirleaf

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikation

Walker, A., Bergmann, M., Camdereli, J., Kaiser, R., Lübke, N., Timm, J., (2017), A genotype independent, full-genome reverse-transcription protocol for HCV genotyping and resistance testing. *J Clin Virol*, (91) S. 42-48. [1]

Zusammenfassung

Hepatitis C ist eine der häufigsten Infektionserkrankungen weltweit und ist mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen assoziiert, wie z.B. Leberzirrhose, Hepatozellulärem Karzinom und Leberversagen. Adäquate Diagnostik und Behandlung haben daher einen hohen Stellenwert in der Bekämpfung der Hepatitis C. Die Zulassung der *direct-acting antivirals* (DAA) zur kurativen Therapie der chronischen Hepatitis C revolutionierte die Behandlung durch eine deutlich kürzere Therapiedauer, signifikant weniger und mildere Nebenwirkungen als bisherige Therapien, sowie Heilungsraten von mehr als 90%. Nichtsdestotrotz spielt die HCV-Genotypisierung nach wie vor eine wichtige Rolle bei der Wahl der richtigen Therapiepräparate, ebenso wie die Untersuchung auf Resistenzen, welche ein Ansprechen auf die Therapie verhindern können. Ziel dieser Dissertation war die Optimierung des diagnostischen Ablaufs vor Therapiebeginn, um Kosten und Zeit bei der HCV-Genotypisierung und HCV-Resistenztestung einzusparen.

Aus Patientenproben gewonnene HCV-RNA wurde in einem ersten Schritt mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Das DNA-Produkt diente anschließend als PCR-Substrat für alle weiteren diagnostischen Schritte. Im Fokus der Arbeit stand die Testung verschiedener RT-Primer und RT-Primerkombinationen, die eine möglichst universelle Transkription der HCV-RNA in cDNA gewährleisten sollten. Im Verlauf dieser Arbeit ist es mir gelungen, alle für die HCV-Genotypisierung und HCV-Resistenztestung relevanten RNA-Abschnitte in einem initialen Schritt in cDNA umzuschreiben. Die dabei transkribierte DNA konnte daraufhin als Matrize für die Genotypisierung verwendet werden. Darüber hinaus kann sie auch zu späteren Zeitpunkten erneut für diagnostische Untersuchungen, wie die Testung auf Resistenzen bei Therapieversagen, herangezogen werden.

Die erfolgreiche Etablierung des vereinfachten Untersuchungsprotokolls für die Genotypisierung und Resistenztestung von HCV-RNA ermöglicht eine kostengünstigere und zeitsparendere Diagnostik von HCV-Patientenproben im Vergleich zu zuvor etablierten diagnostischen Protokollen. Das zunächst erzeugte Zwischenprodukt aus cDNA ist deutlich stabiler in der Lagerung als HCV-RNA und kann unter Einsparung von weiteren RT-Reaktionen jederzeit direkt für weitere Untersuchungen herangezogen werden.

Summary

Hepatitis C is one of the most common infectious diseases worldwide. Its sequelae can lead to severe complications, including liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and liver failure. Adequate diagnostics and treatment are therefore crucial in reducing the burden of hepatitis C. After the approval of direct-acting antivirals (DAA) for curative treatment of chronic hepatitis C, the management of patients with hepatitis C changed drastically. The new medications allowed for a significantly reduced duration of treatment, fewer and lighter adverse effects compared to other therapy regimens, and success rates of more than 90%. Nevertheless, HCV genotyping and HCV resistance testing are still crucial for choosing the appropriate drug regimens and in order to avoid treatment failure. The objective of this dissertation was to facilitate the diagnostic workflow before initiating HCV therapy in order to reduce both costs and hands-on time during HCV genotyping and HCV resistance testing.

In a first step, HCV-RNA from a patient sample was transcribed into cDNA using reverse transcription (RT). The resulting cDNA product served as the PCR substrate for all following diagnostic steps. The focus of the work was testing different RT primers and RT primer combinations that would allow for the transcription of all diagnostically relevant HCV-RNA sections into cDNA. I successfully implemented a new protocol for HCV genotyping and HCV resistance testing with a single initial RT reaction. During this first step, all HCV-RNA sections of interest were transcribed into cDNA. The cDNA was subsequently used as a template for genotyping as well as resistance testing which can be conducted immediately following the RT reaction or at a later point in time, e.g., after initial therapy failure.

The simplified protocol for HCV genotyping and HCV resistance testing from HCV-RNA is a cost-effective and time-saving alternative to common diagnostic protocols. Moreover, the cDNA that is obtained in the first step is considerably more stable than HCV-RNA when being stored. At any time, it can directly be used for further diagnostics without the need for repeated RT reactions.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare	UV	ultraviolett
°C	Celsius	vgl.	vergleiche
cDNA	<i>complementary DNA</i>	VL	Viruslast
DAA	<i>direct-acting antivirals</i>	z.B.	zum Beispiel
DNA	<i>deoxyrebonucleic acid</i>		
GT	Genotyp		
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung		
HCV	Hepatitis-C-Virus		
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>		
IU	<i>international units</i>		
kb	Kilobase/n		
M	Mol		
Min./min	Minute/n		
mL	Milliliter		
mM	Millimol		
µg	Mikrogramm		
µL	Mikroliter		
NTR	Nicht-translatierte Region		
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>		
pmol	Pikomol		
RAV	<i>resistance associated variants</i>		
RNA	<i>ribonucleic acid</i>		
RR	Resistenzrelevante Region		
RT	Reverse Transkription		
s.	siehe		
Sek./sek	Sekunde/n		
SVR	<i>sustained virological response</i>		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatitis C.....	1
1.2	Aufbau des HCV-Genoms	2
1.3	HCV-Genotypen und HCV-Subtypen	3
1.4	HCV-Behandlung	4
1.4.1	Alte Therapie vor 2015.....	4
1.4.2	Neue Therapie – Direct-Acting Antivirals (DAA).....	5
1.5	Resistenzen	6
1.6	Diagnostik	7
1.6.1	Genotypisierung	7
1.6.2	Resistenztestung	8
1.6.3	Bisheriger diagnostischer Ablauf.....	9
1.6.4	Ziele der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme	12
2.1.3	Kits.....	13
2.1.4	Software	13
2.1.5	Patientenproben	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Probenentnahme und Aufbereitung.....	14
2.2.2	Reverse Transkription	14
2.2.3	Geschachtelte („Nested“) PCR	14
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	20
2.2.5	DNA-Aufreinigung	20
2.2.6	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	21
2.2.7	Sequenzierung.....	21
2.2.8	Sequenzanalyse.....	21

3	<i>Ergebnisse</i>	22
3.1	Zwei Primer in einer RT-Reaktion (p874A und SV542as)	22
3.2	Das komplette HCV-Genom kann in cDNA umgeschrieben werden (SV542as)	24
3.3	Anwendbarkeit bei verschiedenen Virus-RNA-Konzentrationen (SV542as)	26
3.3.1	Patientenproben mit verschiedenen HCV-RNA-Konzentrationen	26
3.3.2	Verdünnungsreihe einer HCV-RNA-Probe	27
3.4	Genotypunabhängige Reverse Transkription des kompletten HCV-Genoms (SV542as)	28
3.5	Universeller HCV-Testansatz (SV542as, p874As, und x-tail) – Teil 1: Genotypisierung	30
3.5.1	Klinische Anwendung in der HCV-Diagnostik	32
3.6	Universeller HCV-Testansatz (SV542as, p874As, und x-tail) – Teil 2: Resistenztestung	34
3.7	Austausch der Reverse-Primer (SV542as, Oligo d(A), und x-tail)	38
3.7.1	Effektivität von drei möglichen Reverse-Primern	38
3.7.2	RT-Ansatz mit Oligo d(A) und Core-Primer (p874as)	39
3.8	Durchführbarkeit der Resistenzprotokolle ausgehend von einem RT-Ansatz (Oligo d(A) und p874as)	41
3.8.1	Genotyp 1a	41
3.8.2	Genotyp 1b	42
3.8.3	Genotyp 3	43
3.8.4	Genotyp 2 und 4	43
3.8.5	Überführung in die Routinediagnostik	45
4	<i>Neuer Diagnostischer Ablauf</i>	46
5	<i>Diskussion und Schlussfolgerungen</i>	48
	<i>Literatur- und Quellenverzeichnis</i>	53
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	58
	<i>Tabellenverzeichnis</i>	61
	<i>Danksagung</i>	62

1 Einleitung

1.1 Hepatitis C

Im Jahr 2016 wurden dem Robert Koch Institut 4368 Erstdiagnosen von HCV-Infektionen in Deutschland gemeldet. Dabei sind das Teilen von Injektionsbesteck bei intravenöser Drogenapplikation und ungeschützter Analverkehr die Hauptrisikofaktoren für die Übertragung des HC-Virus. Bluttransfusionen stellen ebenfalls ein Risiko dar, welches jedoch in Deutschland nach der Einführung strenger Kontrollen von Spendern und Konserven an Relevanz verloren hat. Es gibt allerdings auch heutzutage noch viele HCV-positive Patienten, deren Infektionsursprung auf kontaminierte Blutkonserven vor 1991 zurückzuführen ist [2, 3].

Das Hepatitis-C-Virus kann sowohl eine akute als auch eine chronische Hepatitis verursachen. Etwa 20-30% der Infektionen heilen innerhalb von sechs Monaten spontan aus [4]. Wichtige Faktoren, die den Verlauf der Infektion negativ beeinflussen können, sind z.B. eine Ko-Infektion mit HIV, immunsuppressive Therapien, eine lange Dauer der Infektion, genetische Faktoren, wie männliches Geschlecht, und ein höheres Lebensalter des Patienten [5, 6]. Etwa 70-80% und damit der Großteil aller Infektionen führt im Verlauf der Infektion zu einer chronischen Hepatitis. Per definitionem spricht man von einer chronischen Infektion mit HCV, wenn mehr als sechs Monate nach Infektionsbeginn noch HCV-RNA im Patientenserum nachweisbar ist. Dies ist immer dann der Fall, wenn es dem Wirtsorganismus nicht gelingt, sich vollständig vom Virus zu befreien [7-9]. Dabei zählen der schnelle Replikationszyklus des HC-Virus, sowie seine hohe Mutationsrate zu den entscheidenden Mechanismen, mit denen sich das HC-Virus dem Immunsystem entzieht. Aufgrund der hohen Mutationsrate existiert HCV in einer infizierten Person als ein Schwarm ähnlicher – aber nicht identischer – Viren, die gemeinsam als Quasispezies bezeichnet werden. Dadurch kann sich HCV rasch an geänderte Replikationsbedingungen anpassen und der Immunantwort entgehen oder Mutationen selektieren, die zu einer Resistenz gegen Therapiewirkstoffe führen [10-12].

Die Prävalenz der durch das HC-Virus verursachten chronischen Hepatitiden in Europa lag im Jahr 2014 bei 15 Millionen (WHO-Region Europa) [2]. Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 71 Mio. Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert [13, 14].

HCV ist daher hochbedeutsam als Ursache chronischer Hepatitiden sowie für die damit einhergehenden hohen Inzidenzen von Leberzirrhose [15], Portaler Hypertension, Hepatozellulärem Karzinom, Leberversagen und die oftmals daraus resultierende Indikation für eine Lebertransplantation [7, 16-20].

1.2 Aufbau des HCV-Genoms

Das Hepatitis-C-Virus gehört zu den einzelsträngigen, positiv polarisierten RNA-Viren und besitzt ein Genom mit einer Länge von ca. 9,6 kb. Wie die meisten RNA-Viren wird das HCV-Genom in Genomabschnitte unterteilt, welche die Kodierungen für unterschiedliche Proteine im Replikationszyklus des Virus enthalten (s. Abb. 1). Anfang und Ende des RNA-Strangs bilden die NTRs (Nicht-translatierte-Region) des 5'- sowie des 3'-Endes. Sie weisen eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf und sind bei der Replikation von Bedeutung [21, 22]. Die 5'NTR spielt als Internal Ribosome Entry Site (IRES) außerdem eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Translation [23]. Von ihr ausgehend wird die HCV-RNA in ein einziges Polyprotein bestehend aus ca. 3000 Aminosäuren translatiert. Dieses Polyprotein wird anschließend durch zelluläre sowie virale Proteasen in die einzelnen Virusproteine gespalten [22].

Vom 5'-Ende ausgehend folgt auf die 5'NTR zunächst der Core-Abschnitt, welcher das Kapsid bildet und die einzelsträngige Virus-RNA bindet [22]. Es folgen die Abschnitte E1 und E2, die viralen Hüllproteine (Envelope), die nach Heterodimerisierung nach außen als Bindungsstelle für zelluläre Rezeptoren (CD81, SRB1, Claudin-1, Occludin) dienen und eine entscheidende Rolle beim Eintritt des Virions in die Wirtszelle zu spielen scheinen [24, 25]. Bei P7 handelt es sich um ein Membranprotein, welches durch Bildung von hexameren und heptameren Komplexen einen Ionenkanal bildet. Es scheint außerdem als Hilfsprotein an der Freisetzung des Virus aus der Zelle beteiligt zu sein, indem es ein Ansäuern der sekretorischen Vesikel und damit die Inaktivierung der Viruspartikel verhindert. Dahinter liegen die sogenannten Nicht-Struktur-Segmente (*Non-Structural*, NS), bei denen NS2, NS3, NS4A und NS4B, sowie NS5A und NS5B unterschieden werden. NS2 kodiert für eine durch Homodimerisierung aktivierte Cysteinprotease, die das Polypeptid zwischen NS2 und NS3 spaltet. NS3 vereint zwei enzymatische Zentren und fungiert einerseits als Serinprotease, die zur Prozessierung des Polypeptides dient, andererseits als Helikase, welche für die RNA-Replikation benötigt wird. NS4A ist als Kofaktor bedeutend für die Funktion der NS3-Serinprotease, indem es sie durch Bildung eines Heterodimers aktiviert. NS4B dient vermutlich der Virusvermehrung, indem es zunächst Membranvesikel bildet, aus denen sich daraufhin membranöse Netzwerke formen, an denen letztlich die Virusvermehrung stattfindet [21, 22]. NS5A ist ein Phosphoprotein, welches abhängig davon, ob es hypophosphoryliert oder hyperphosphoryliert vorliegt, zur RNA-Replikation beiträgt oder der Virusmontage dient. Es trägt damit maßgeblich zur Steuerung der Replikation bei [26, 27]. NS5B ist eine RNA-Polymerase und damit für die Replikation von entscheidender Bedeutung. Als letztes folgt daraufhin die 3'NTR [21, 22].



Abb. 1: **Schematische Darstellung des HCV-Genoms.** Die Virus-RNA wird der Konvention nach vom 5'- zum 3'-Ende hin gelesen. Beide Enden sind Teil der HCV-RNA, werden jedoch nicht translatiert (NTR). Die ersten drei translatierten Abschnitte sind die Strukturproteine Core, E1 und E2 (blau), welche direkt am Aufbau des Virions beteiligt sind. Darauf folgen die sieben Nicht-Struktur-Proteine P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (gelb). Sie haben z.B. enzymatische Funktionen und dienen der Virusreplikation.

NTR: Nicht-translatierte Region

1.3 HCV-Genotypen und HCV-Subtypen

Der allgemeine Aufbau ist allen HC-Viren gemeinsam. Sie unterscheiden sich dennoch erheblich in ihren Sequenzen und werden deswegen in sieben Genotypen (1-7) unterteilt, die chronologisch nach ihrer Erstbeschreibung nummeriert werden. Die Genotypen werden weiter in insgesamt 67 Subtypen unterteilt (s. Tabelle 1). Die Bezeichnung der Subtypen erfolgt über einen auf die Nummerierung folgenden Buchstaben (Genotyp 1a, 1b, etc.) [28]. Von einem neuen Genotyp wird ab einer Sequenzabweichung von mehr als 30 % auf Nukleotidebene gesprochen, von einem neuen Subtyp ab einer Abweichung von mindestens 15 % innerhalb eines Genotyps [29-31].

HCV Geno- und Subtypen

Genotyp 1	Genotyp 4
1a	4a
1b	Genotyp 5
1c	5a
Genotyp 2	Genotyp 6
2a	6a
2b	6b
2c	6d
2k	6g
Genotyp 3	6h
3a	6k
3b	Genotyp 7
3k	7a

Tabelle 1: **Übersicht über die Namen häufiger, allgemein anerkannter Geno- und Subtypen.** Bislang wurden 7 verschiedene HCV Genotypen beschrieben. Neben den genannten Subtypen existieren weitere hier nicht aufgeführte Subtypen. Verschiedene Genotypen weichen in ihrer Genomsequenz um mehr als 30% voneinander ab. Subtypen weichen um mindestens 15% voneinander ab.

Die Häufigkeit der verschiedenen Geno- und Subtypen ist geographisch sehr variabel. Genotyp 1 ist weltweit am weitesten verbreitet [32]. In den USA und Europa und mitunter auch in Deutschland finden sich hauptsächlich die Typen 1a, 1b, 2a, 2b und 3a. Dahingegen macht beispielsweise in Afrika der Genotyp 4 den größten Anteil aus [28, 30].

1.4 HCV-Behandlung

1.4.1 Alte Therapie vor 2015

Bis ins Jahr 2015 bestand die Standardtherapie einer chronischer Hepatitis C bzw. einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus aus einer Monotherapie mit pegyliertem Interferon-alpha oder einer Kombination aus pegyliertem Interferon-alpha und Ribavirin. Abhängig vom Genotyp war dabei eine Behandlungsdauer von sechs bis zwölf Monaten erforderlich [16, 17, 33]. Viele Patienten zeigten außerdem erhebliche durch diese Substanzen hervorgerufene Nebenwirkungen, wie z.B. neuropsychiatrische Auffälligkeiten, hämatologische Veränderungen, Schilddrüsenerkrankungen, und andere endokrine Dysregulationen [33-37]. Darüber hinaus lag die Erfolgsrate mit vollständiger Ausheilung der Infektion (*Sustained Virological Response, SVR*), nachgewiesen durch ein negatives Testergebnis einer sensitiven PCR für HCV-RNA, auch nach leitliniengerechter

Durchführung der Therapie für den häufigsten HCV Genotyp (1a, 1b) bei unter 50% [7, 38].

1.4.2 Neue Therapie – Direct-Acting Antivirals (DAA)

Mit der Zulassung der sogenannten *direct-acting antivirals* (DAA), haben sich die Therapieoptionen sowie die Heilungschancen bei chronischer Hepatitis C dramatisch verbessert. Es gibt drei Substanzklassen: (NS3-) Proteasehemmer, NS5A-Hemmer, und (NS5B-) Polymerasehemmer (s. Tabelle 2 u. Abb. 4), die unterschiedlich kombiniert werden (s. Tabelle 3) [39]. Seit der Einführung der DAA-Therapie besteht die Möglichkeit zur Interferon (IFN)- und (teilweise) Ribavirin-freien Behandlung [40, 41]. Die jetzt zugelassenen Substanzen sind sehr gut verträglich und scheinen, allenfalls leichte bis mittelschwere Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen, Kraftlosigkeit oder gastrointestinale Beschwerden zu verursachen, welche jedoch nicht zwangsläufig einer Beendigung der Therapie bedürfen [42]. Die Therapie mit DAA stellt damit zum einen eine für den Patienten deutlich leichter zu tolerierende Behandlungsform dar; zum anderen ist auch die Dauer, über welche die DAA vom Patienten eingenommen werden müssen, mit ca. sechs bis max. 16 Wochen wesentlich kürzer als bei früheren Therapieregimen (vgl. 1.4.1) [39, 43]. Vor allem aber liegt die Heilungsrate (SVR) nach Therapie mit DAA unabhängig vom Genotyp nunmehr bei über 90% der behandelten Patienten [37, 44].

HCV-Region	Substanzklasse	Substanz
NS3	Protease Inhibitoren	Simeprevir
		Paritaprevir
		Grazoprevir
		Glecaprevir
		Voxilaprevir
NS5A	NS5A-Inhibitoren	Daclatasvir
		Ombitasvir
		Ledipasvir
		Elbasvir
		Velpatasvir
		Pibrentasvir
NS5B	Nukleosidische Polymerase Inhibitoren	Sofosbuvir
	Nicht-Nukleosidische Polymerase Inhibitoren	Dasabuvir

Tabelle 2: **Übersicht über zur HCV-Therapie zugelassene Direct-Acting Antivirals (DAA).** [45] Die einzelnen Wirkstoffe sind nach Substanzklassen und HVC-Genomregionen, die als Ansatzstellen der Präparate dienen, sortiert.

Peg-Interferon alfa-2a		Protease-Inhibitoren	
Ribavirin		<i>Glecaprevir</i>	GLE
		<i>Grazoprevir</i>	GRZ
Kombipräparate		<i>Simeprevir</i>	SMV
<i>Harvoni</i> [®]	LDV+SOF	<i>Paritaprevir</i>	PTV
<i>Technivie</i> [®]	PTV+OMV+Ritonavir	<i>Voxilaprevir</i>	VOX
<i>Viekira Pak</i> [®]	PTV+OMV+Ritonavir+DSV	NNSA-Inhibitoren	
<i>Zepatier</i> [®]	GRZ+EBV	<i>Daclatasvir</i>	DCV
<i>Epclusa</i> [®]	VEL+SOF	<i>Ledipasvir</i>	LDV
<i>Mavyret</i> [®]	GLE+PIB	<i>Ombitasvir</i>	OMV
<i>Vosevi</i> [®]	VOX+VEL+SOF	<i>Velpatasvir</i>	VEL
		<i>Pibrentasvir</i>	PIB
		<i>Elbasvir</i>	EBV
		Polymerase-Inhibitoren	
		<i>Sofosbuvir</i>	SOF
		<i>Dasabuvir</i>	DSV

Tabelle 3: **Übersicht über zur HCV-Therapie zugelassene Kombinationspräparate.** Dargestellt sind die Namen der Kombinationspräparate sowie deren Zusammensetzung aus Einzelpräparaten. Die Einzelpräparate sind nach Substanzklassen sortiert [45].

1.5 Resistenzen

Mit der Einführung der *direct-acting antivirals* (DAA) wurde auch die Testung auf mögliche Resistenzen von zunehmender Bedeutung [46]. Dabei können Genotyp abhängige „natürliche“ Resistenzen von vorbestehenden resistenz-assoziierten Polymorphismen in therapie-naiven Patienten (d.h. schon vor Ersttherapie beschrieben) sowie von unter Therapie erworbenen Resistenzen unterschieden werden. Unzureichendes Ansprechen auf die Therapie, welches bei einigen Genotypen natürlicherweise vorkommt, spiegelt die Tatsache wider, dass nicht alle DAA bei allen Genotypen ausreichende Wirkung zeigen und deswegen nicht für alle Genotypen zugelassen sind [47]. Darüber hinaus gibt es Virusstämme, die gegen einzelne DAA Resistenzen gebildet haben. Die Therapie mit dem jeweiligen Wirkstoff ist dabei bei dem entsprechenden Genotyp aber grundsätzlich zugelassen [48, 49]. In manchen Fällen einer HCV-Infektion lassen sich auch über den Verlauf einer Erkrankung bzw. einer HCV-Therapie Veränderungen auf Sequenzebene verzeichnen, die zum Teil mit neu entstandenen Resistenzen einhergehen können [50].

Da die DAA an einem der drei HCV-Genomabschnitte NS3, NS5A oder NS5B ansetzen, sind Mutationen in diesen Bereichen bei der Resistenztestung von Interesse [51]. Eine Substitution z.B. in NS3 an Position 80 kann z.B. zu einem schlechteren Ansprechen auf Simeprevir, einem NS3-Protease-Inhibitor, führen [52]. Bei einer genotypischen Resistenztestung kann das HC-Virus des Patienten auf bereits vorbeschriebene resistenz-assoziierte Mutationen untersucht werden und bei der Wahl der Medikamente für eine Therapie berücksichtigt werden [48, 53]. Bei Therapieversagen, erfolgt meist im Anschluss eine Sequenzierung mit Sequenzanalyse auf mögliche Mutationen. Dabei können sowohl bekannte resistenz-assoziierte Mutationen identifiziert als auch neue entdeckt werden. Von Interesse ist hierbei, dass für eine vollständige Resistenztestung alle drei Regionen (NS3, NS5A und NS5B) auf Mutationen untersucht werden müssen (s. Abb. 2) [54]. Im Ablauf der Genotypisierung und Resistenzbestimmung werden üblicherweise spezifische RT-PCRs für alle zu untersuchenden Abschnitte durchgeführt. Daher sind für die Bestimmung des Genotyps sowie eine Testung auf Resistenzen in allen drei potentiellen Regionen (NS3, NS5A und NS5B) bis zu vier RT-Reaktionen mit anschließenden PCRs nötig.

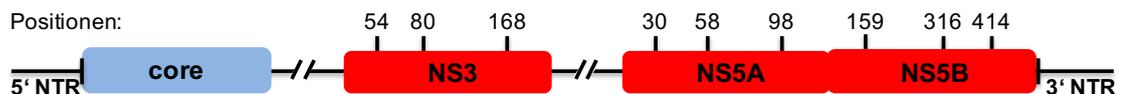


Abb. 2: **Positionen von wichtigen Resistenzen im HCV-Genom.** Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). NS3, NS5A und NS5B (rot) sind Angriffspunkte der DAA. Wichtige Positionen von zu Resistenzen führenden Mutationen auf Aminosäureebene sind in Bezug auf die entsprechenden Genomabschnitte eingezeichnet.

1.6 Diagnostik

1.6.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung werden bislang Hybridisierungstechniken (Abbott RealTime HCV Genotype II, Versant Line Probe Assay (LiPA) 2.0) verwendet [55-57], oder je nach Labor entweder ein Abschnitt aus dem Core- oder aus dem NS5B-Bereich (s. Abb. 3) amplifiziert und sequenziert [58]. Über diese beiden Regionen (Core und NS5B) ist durch Abgleich mit Datenbanken eine Zuteilung zu einem bestimmten Geno- und Subtyp möglich. Dies liegt daran, dass im Gegensatz zu anderen Abschnitten Core und NS5B konservierte Regionen beinhalten, die sich besonders gut für die Genotypisierung eignen [59, 60].



Abb. 3: **Schematische Darstellung des HCV-Genoms mit den bei der Genotypisierung verwendeten Abschnitten.** Das HCV-Genom vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Die bei die Genotypisierung untersuchten Genomabschnitte sind Core und NS5B (grün).

Die Genotypisierung mittels Sequenzanalyse wird als Goldstandard angesehen, da sie die exakte Virussequenz wiedergibt [61]. Im Gegensatz dazu erlaubt die Hybridisierung mit genotypspezifischen Sonden oft lediglich eine einfache Zuordnung zum Genotyp. Dabei kommt es v.a. bei der Subtypen-Spezifizierung gehäuft zu fehlerhaften Ergebnissen [62, 63]. Zudem erfolgt bei selteneren Subtypen keine genaue Zuordnung über den einfachen Genotyp hinaus [57]. Einige Genotypen werden von den Hybridisierungsverfahren überhaupt nicht abgedeckt, sodass sehr seltene Genotypen nicht identifiziert werden können [64]. Erfolgt hingegen eine Sequenzierung, sind genauere Zuordnungen und Analysen auch zu späteren Zeitpunkten noch möglich. Auf Grund der Einzigartigkeit jeder Patientenprobe erlaubt die Genotypisierung mittels Sequenzanalyse darüber hinaus auch Rückschlüsse auf mögliche Kontaminationen von diagnostischen Proben im Untersuchungsprozess sowie das Erkennen rekombinanter Virustypen. Bei Letzteren handelt es sich um Rekombinationen zweier unterschiedlicher Virusstämme. Die Genotypisierung des Core-Fragments lässt dabei eine andere Zuordnung zu als die des NS5B-Fragments. Ein Beispiel hierfür ist die 2k/1b-Variante, bei welcher der vordere Teil des Genoms (inkl. Core) dem Subtyp 2k entspricht, wohingegen der hintere Abschnitt ab NS2 (inkl. NS5B) dem Subtyp 1b zuzuordnen ist (vgl. Abb. 3). Diese Sonderformen werden für gewöhnlich mittels Hybridisierung nur unzureichend erkannt und die Patientenproben deswegen irrtümlicherweise einem der beiden Genotypen zugeordnet. Die fehlerhafte Genotypisierung kann zu weitreichenden Konsequenzen bezüglich der Auswahl und der Effektivität des antiviralen Therapieregimes führen [65]. Mittels Sequenzierung und Sequenzanalyse sind auch rekombinante Geno- bzw. Subtypen eindeutig zu erkennen. Dazu ist es jedoch erforderlich, beide Fragmente (Core und NS5B) zu genotypisieren, was in der Routinediagnostik bislang nicht üblich ist [66].

1.6.2 Resistenztestung

Für die Resistenztestung können je nach Genotyp und Vortherapie die drei HCV-Genomabschnitte NS3, NS5A sowie NS5B (s. Abb. 4) auf bekannte Mutationen untersucht werden. Dazu werden sie jeweils sequenziert und die Sequenzen mit einer Datenbank verglichen. Sollten sich dabei vorbeschriebene resistenz-assoziierte Mutationen innerhalb eines der Genomabschnitte befinden, ist die Gabe des an diesem

Genomabschnitt ansetzenden Medikaments möglicherweise mit geringeren Erfolgsaussichten verbunden. Der Resistenzgenotyp trägt dadurch zu der Wahl der optimalen Medikamente für eine Therapie bei [67, 68].

Ausschlaggebend bei der Entscheidung, welche Resistenzprotokolle für einen Geno- oder Subtyp durchgeführt werden, ist zunächst, ob grundsätzlich ein DAA für den jeweiligen Genomabschnitt bei dem zu untersuchenden Genotyp zugelassen ist. Es ist z.B. nicht möglich auf Resistenzen im Genomabschnitt NS3 zu testen, wenn für den zu untersuchenden Genotyp kein DAA zugelassen ist, welches im Genomabschnitt NS3 ansetzt. Darüber hinaus ist eine Resistenztestung für einen bestimmten Abschnitt nur dann sinnvoll, wenn Resistenzen gegen DAA in diesen Abschnitt vorbeschrieben sind, oder wenn die Therapie mit einer bestimmten Substanzklasse bereits fehlgeschlagen ist [30].

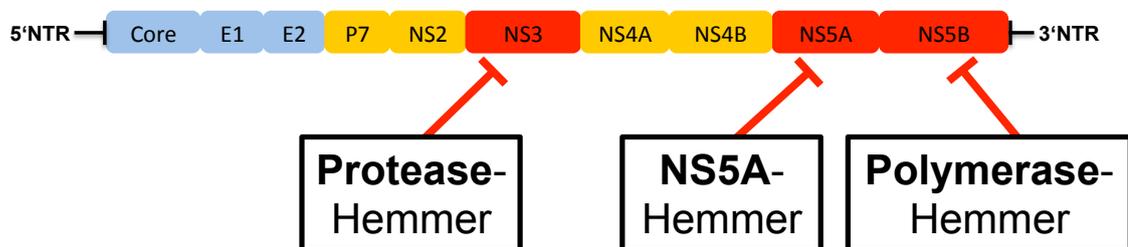


Abb. 4: **Bedeutende Genomabschnitte für die Resistenztestung des HC-Virus.** Das HCV-Genom ist vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Wichtige Genomabschnitte für die Resistenztestung bei HC-Viren sind NS3, NS5A und NS5B (rot). Die zur Verfügung stehenden Medikamentengruppen (DAA) hemmen jeweils spezifisch die Funktion eines dieser Genomabschnitt.

1.6.3 Bisheriger diagnostischer Ablauf

In der Diagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden HCV-positiv getestete Patientenproben nach ihrer Aufreinigung (RNA-Extraktion in ein RNA-Eluat) über das Core-Fragment genotypisiert. Dazu wurde bislang eine Reverse Transkription durchgeführt, bei der ein spezifischer Primer direkt an dem zu untersuchenden Genomabschnitt (hier: Core) ansetzt. Die gewonnene cDNA wurde daraufhin mittels einer geschachtelten PCR mit weiteren spezifischen Primern amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei der Sequenzanalyse wurde die Sequenz des Core-Abschnitts mit einer Datenbank verglichen und so einem Genotyp zugeordnet (s. Abb 5; 1). Der ermittelte Genotyp entschied im Weiteren darüber, für welche der drei Abschnitte (NS3, NS5A und NS5B) die Durchführung einer Resistenztestung sinnvoll wäre (vgl. 1.6.2) [69]. Ausgehend vom identifizierten Genotyp wurde erneut auf das vormals extrahierte RNA-Eluat zurückgegriffen (s. Abb. 5; 2). Vom RNA-Eluat ausgehend wurden erneut bis zu drei

weitere spezifische RT-Reaktionen angesetzt (s. Abb. 5; 3), abhängig davon, welche der drei Abschnitte (NS3, NS5A und NS5B) auf Resistenzen getestet werden sollten [52].

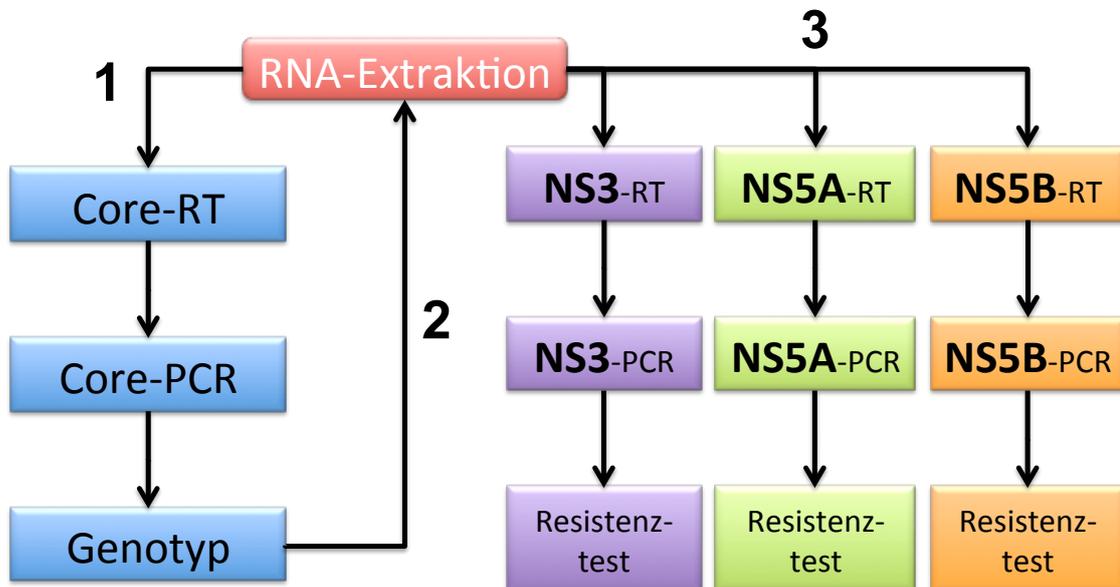


Abb. 5: **Flow-Chart des bisherigen Ablaufs bei der Diagnostik einer HCV-Probe.** Der Core-Abschnitt der HCV-RNA einer Patientenprobe wird mit einer spezifischen RT-Reaktion in cDNA transkribiert. Core wird anschließend mittels PCR amplifiziert, sequenziert, analysiert und einem Genotyp zugeordnet (1). Abhängig vom Ergebnis wird zum einen die passende Therapie gewählt. Zum anderen können je nach Genotyp die für den Genotyp zugelassenen DAA (gegen NS3, NS5A und NS5B) auf vorhandene Resistenzen getestet werden. Hierzu wird erneut das RNA-Eluat herangezogen (2) und in die jeweils dem Therapieschema entsprechenden RT-Reaktionen überführt. Für jedes Resistenzprotokoll wird eine eigene spezifische Reverse Transkription durchgeführt. Die Produkte werden jeweils in die entsprechenden PCRs überführt, anschließend sequenziert und auf bekannte Resistenzen analysiert (3).

1.6.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Vereinfachung des bisherigen diagnostischen Ablaufs bei der Genotypisierung und Resistenzbestimmung von Hepatitis-C-Viren aus Blutproben von Hepatitis-C-positiven Patienten. Sowohl zur Genotypisierung als auch zur Resistenztestung ist jeweils eine Sequenzanalyse des Virusgenoms notwendig. Dieser geht immer eine PCR zur Amplifikation des Genomabschnitts von Interesse voraus. Zur Durchführung jeder PCR muss der entsprechende Bereich des HC-Virusgenom, welches im Virion als RNA vorliegt, zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Transkription in cDNA erfolgt mittels Reverser Transkription ausgehend von der HCV-RNA. Im bisherigen diagnostischen Ablauf wurde immer nur ein spezifischer Bereich des Virusgenoms zunächst von RNA in cDNA transkribiert und anschließend mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Der Arbeitsschritt der Reversen Transkription ist dabei besonders kosten- und zeitaufwändig und eine Einsparung an dieser Stelle stellte daher das größte Potential zur Vereinfachung des diagnostischen Ablaufs dar.

Eine Transkription des gesamten HCV-Genoms von RNA in cDNA würde es ermöglichen, alle weiteren für die Genotypisierung und Resistenztestung benötigten PCRs - ausgehend von einem initial gewonnenen cDNA-Produkt - durchzuführen. Dabei ist von Bedeutung, dass zumindest die Abschnitte, welche für die spätere Diagnostik von Interesse sind, in zusammenhängenden cDNA-Molekülen transkribiert werden. Um mehrere der bislang für die Genotypisierung und Resistenztestung benötigten RT-Reaktionen zusammenzufassen, musste zunächst ermittelt werden, welche Primer simultan in einer RT-Reaktion verwendet werden können. Des Weiteren sollte die maximale Länge der umgeschriebenen cDNA ermittelt werden, um die notwendige Anzahl von RT-Primern sowie deren Ansatzstellen am Virusgenom zu bestimmen. Ziel war es dabei die Anzahl der benötigten RT-Primer so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig eine stabile Amplifikation auch bei geringen Viruslasten zu gewährleisten. Zuletzt musste die Anwendbarkeit bei allen relevanten Genotypen sichergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Automatisiertes Nukleinsäure-Reinigungssystem	EZ1 Advanced XL, Qiagen, Deutschland; EZ1 Advanced Virus Card v2.0, Qiagen, Deutschland
Spektrophotometer	Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA, Sirs Lab, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler, Nexus, Eppendorf, Deutschland; T3000, Biometra, Deutschland; Professional Trio, Biometra, Deutschland/ Analytik Jena, Deutschland
Spannungsquelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

5X First-Strand Buffer	Invitrogen, USA
0,1 M DTT	Invitrogen, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 0,025%	Roth
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA
dNTPs (10 mM each)	Invitrogen, USA
H ₂ O (Nuklease-frei)	Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA
RNAse Inhibitor, Murine	New England Biolabs® Inc. USA
SuperScript™III RT (200 U / µL)	Invitrogen, USA

TBE Puffer	Sigma-Aldrich
QX DNA Dilution Buffer 15 ml	Qiagen, Deutschland
QX Size Marker 250bp-4kb (50 µL) v2.0	Qiagen, Deutschland
Größenmarker für Gelelektrophorese	Gene Ruler 1 KB, Thermo Fisher Scientific, USA; Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific, USA; Green 6x loading Dye, Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.3 Kits

GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, USA
HotstarTaq Plus PCR DNA Polymerase	Qiagen, Deutschland
Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, USA
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Deutschland
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, USA
TaKaRa Ex Taq HotStart Version	Clontech Laboratories, USA

2.1.4 Software

Geneious Software v10.2.6	Biomatters, New Zealand
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, USA
Endnote X9.3.2	Clarivate Analytics, USA

2.1.5 Patientenproben

Im Rahmen von Studien wurde Patienten Blutproben entnommen. Diese wurden anschließend aufgereinigt, sodass die im Blut enthaltene Hepatitis-C-Virus-RNA für wissenschaftliche Experimente verwendet werden kann. Der Verwendung des Patientenmaterials im Labor stimmten alle an den Studien Teilnehmenden freiwillig und schriftlich in Form einer Einverständniserklärung zu. Im Laufe dieser Arbeit wurden Proben von Patienten im Rahmen folgender Studien verwendet: Die PEPSI-Studie trägt Informationen von HCV-Patienten und Virusgenomen zusammen. Ziel ist es, Resistenztestungen auf Genomebene für die Vorhersage des späteren Therapieerfolges zu verwenden. Die Proben aus der PEPSI-Kohorte mit der Studiennummer 2012048 bei der

Ärztchammer Nordrhein wurden von Rolf Kaiser von der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt. Des Weiteren hat die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen der PWID-Kohorte (*People Who Inject Drugs*) eine Zulassung mit der Studiennummer 13-5643-BO erteilt.

2.2 Methoden

2.2.1 Probenentnahme und Aufbereitung

Das von HCV-positiven Patienten entnommene Blut wird abzentrifugiert und mittels automatisierter Nukleinsäureextraktion innerhalb von 24 Stunden weiter aufbereitet. Verwendet werden dazu der „EZ1 Advanced XL“ und das dazugehörige „EZ1 Virus Mini Kit v2.0“ und die „EZ1 Advanced Virus Card v2.0“ von Qiagen® mit vorprogrammierten Protokollen für den Ablauf der Probenaufreinigung. Als Resultat entsteht ein Eluat mit der darin enthaltenen HCV-RNA. Das Eluat wird bei -20°C gelagert.

2.2.2 Reverse Transkription

Die zuvor aufgereinigte HCV-RNA wird mit der „SuperScript™ III Reverse Transkriptase“ von Qiagen® in cDNA umgeschrieben. Es wird ein Gemisch (Mix1) aus je 1 µL Primer (10 pmol/µL), 1 µL dNTPs (20 mM) und 10 µL RNA-Eluat hergestellt, das mit H₂O auf ein Volumen von 13 µL ergänzt wird. Zum Auftrennen der RNA wird Mix1 mit einem Thermo-Cycler für 5 Min. auf 65 °C erhitzt. Daraufhin wird er auf 25 °C abgekühlt und es werden direkt im Anschluss 7 µL des RT-Reaktions-Gemisches hinzugefügt. Dieses RT-Gemisch wird zuvor aus 4 µL 5x First Strand Buffer, 1 µL 0.1 M DTT, 1 µL RNase-Inhibitor sowie 1 µL des Enzyms Superscript III Reverse Transcriptase angefertigt. Die aus der Zusammenführung von Mix1 und RT-Gemisch hervorgehenden 20 µL Substrat werden für den eigentlichen Schritt der enzymatischen Transkription von HCV-RNA in cDNA für 60 Min. auf 50 °C erhitzt. Anschließend wird das Substrat zur Denaturierung der RNA für 15 Min. auf 70 °C erhitzt. Die transkribierte cDNA ist hitzestabiler als RNA und bleibt dabei als Produkt erhalten. Es folgt ein 4 °C-Schritt zur weiteren Stabilisierung der cDNA. Die 20 µL RT-Produkt mit der darin enthaltenen cDNA werden zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C gelagert (s. Tabelle 4).

2.2.3 Geschachtelte („Nested“) PCR

Zur Amplifikation eines Genomabschnitts von Interesse wird eine PCR durchgeführt. Eine *Nested*-PCR mit zwei hintereinander geschalteten PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren erhöht die Spezifität für den entsprechenden Abschnitt. Dabei dienen bei der zweiten PCR nur die amplifizierten Abschnitte aus der vorherigen PCR als Substrat. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Primerpaar der zweiten PCR ebenfalls an andere, vom

Zielabschnitt abweichende, unspezifische Bereiche bindet, die möglicherweise bei der ersten PCR mitamplifiziert wurden, ist äußerst gering. Dies beruht auf der Tatsache, dass bei der ersten PCR im Gegensatz zur zweiten PCR noch das gesamte Virusgenom als Vorlage zum Binden der Primer zur Verfügung steht, wodurch die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Bindens der Primer relativ gesehen deutlich höher ist.

2.2.3.1 PCR 1

2,5 µL des Forward-Primers 1 und 2,5 µL des Reverse-Primers 1 werden mit 28,75 µL H₂O, 10 µL 5x Colorless GoTaq Buffer, 1 µL dNTPs (20 mM) und 0,25 µL GoTaq zu insgesamt 45 µL Lösung vermischt. Dann werden 5 µL RT-Produkt (cDNA-Lösung), welches zuvor mittels Reverser Transkription gewonnen wurde, hinzugegeben, sodass 50 µL PCR 1-Lösung entstehen. Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts wird die Lösung mit einem Thermo-Cycler zunächst für 1 Min. auf 94 °C erhitzt, wodurch bislang intakt gebliebene RNA denaturiert wird. Es folgen 35 Zyklen, die jeweils aus einem ersten Schritt mit 94 °C zum Aufschmelzen der DNA (*melting*), einem zweiten Schritt mit 55 °C zur Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (*primer annealing*) und einem dritten Schritt mit 72 °C zur Verlängerung ausgehend vom angelagerten Primer (*elongation*) bestehen. Danach wird die Lösung für 10 Min. auf 72 °C erhitzt, um eine abschließende Verlängerung unvollständiger Abschnitte zu ermöglichen. Am Ende der PCR 1 dient ein Kühschritt bei 10 °C-Schritt zur Stabilisierung der amplifizierten DNA. Alle PCR-Protokolle folgen demselben Prinzip, weichen jedoch in ihren exakten Zeiten anhängig vom Genotyp und den verwendeten Primerpaaren teilweise voneinander ab. Die exakten Zeiten ändern sich je nach amplifizierter Region, da die jeweiligen amplifizierten DNA-Abschnitte verschiedene Längen aufweisen und demnach unterschiedlich viel Zeit bei der enzymatischen Verlängerung in Anspruch nehmen (s. Tabelle 4 und Tabelle 5).

2.2.3.2 PCR 2

2,5 µL des Forward-Primers 2 und 2,5 µL des Reverse-Primers 2 werden mit 30,75 µL H₂O, 10 µL 5x Green GoTaq Buffer, 1 µL dNTPs (20 mM) und 0,25 µL GoTaq zu insgesamt 47 µL Lösung vermischt. Dann werden 3 µL PCR-1-Produkt hinzugegeben, sodass 50 µL PCR 2-Lösung entstehen. Das Temperaturprofil entspricht dem von PCR 1.

Reverse Transkription

pan-GT	Zeit	Temp.
	5 min	65 °C
	cool down	25 °C
	60 min	50 °C
	15 min	70 °C
	hold	4 °C

Nested PCR – Genotypisierung

Core _{GT}	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	30 sek	94 °C
	30 sek	55 °C
	1 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

NS5B _{GT}	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	30 sek	94 °C
	30 sek	55 °C
	1 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

Tabelle 4: **Protokoll der Reversen Transkription sowie PCR-Protokolle für die HCV-Genotypisierung.** Der Ansatz zur Reversen Transkription wird mit einem genotypunabhängigen RT-Primer für alle Proben gleichermaßen durchgeführt. Die Primerpaare sowie der zeitliche Ablauf der Protokolle für die Core_{GT}- und die NS5B_{GT}-PCR sind ebenfalls genotypunspezifisch.

Nested PCR – Resistenztestung

NS3_GT1+4	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	1 min	94 °C
	30 sek	55 °C
	2 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

NS5A_GT1,2,4	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	1 min	94 °C
	30 sek	55 °C
	1 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

NS5B_GT1,2,4	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	1 min	94 °C
	30 sek	55 °C
	2 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

NS5A_GT3	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	1 min	94 °C
	30 sek	55 °C
	2 min 30 sek	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

NS5B_GT3	Zeit	Temp.
	1 min	94 °C
	1 min	94 °C
	30 sek	55 °C
	2 min 30 sek	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	10 °C

} 35 Zyklen

Tabelle 5: **PCR-Protokolle für die HCV-Resistenztestungen je nach Genomabschnitt und Genotyp (GT).** Eine Resistenztestung des NS3-Abschnitts kann für die Genotypen 1 und 4 durchgeführt werden. Die Protokolle für die Resistenztestung der NS5A- und NS5B-Abschnitte für die Genotypen 1,2 und 4 und für die Resistenztestung der NS5A- und NS5B-Abschnitte für den Genotyp 3 unterscheiden sich teilweise in der Dauer der einzelnen Zyklen, da diese abhängig ist von der Größe der zu amplifizierenden PCR-Produkte (vgl. Tabelle 6).

2.2.3.3 PCR-Primer

2.2.3.3.1 Core_{GT}-PCR

Als Core_{GT}-PCR wird hier eine *Nested*-PCR bezeichnet, die ein im Core-Abschnitt gelegenes Fragment amplifiziert, welches in der Diagnostik für die Genotypisierung verwendet werden kann. Sie besteht aus einer PCR 1 mit dem Reverse-Primer *p874A* und dem Forward-Primer *p417s*, die 35 Zyklen umfasst. Die entsprechende PCR 2 mit dem Reverse-Primer *p1As* und dem Forward-Primer *p439s* umfasst ebenfalls 35 Zyklen.

2.2.3.3.2 NS5B_{GT}-PCR

Als NS5B_{GT}-PCR wird hier eine *Semi-Nested*-PCR bezeichnet, die ein im NS5B-Segment gelegenes Fragment amplifiziert, welches ebenfalls in der Diagnostik für die Genotypisierung verwendet werden kann. Der Reverse-Primer ist in beiden PCRs *SV542as*. In der PCR 1 dienen die Primer *SV360s + SV361s* als Forward-Primer, in der PCR 2 die Primer *SV362s + SV363s*. Beide PCRs laufen über 35 Zyklen.

2.2.3.3.3 Weitere PCRs

Alle weiteren PCRs sind ebenfalls *Nested*-PCRs. Die für die Resistenztestung verwendeten Primerpaare unterscheiden sich für die einzelnen Genotypen und sind separat dargestellt (s. Tabelle 6).

Genotyp	Region	Nested PCR	Forward-Primer	Sequenz 5'->3'	Revers-Primer	Sequenz 5'->3'	Amplicongröße (bp)
Pan-GT	Core _{GT}	PCR1	p417s	GGYGGYGGNCAGATCGTTGG	p874as	ARGAAGATAGARAARGAGCAACC	457
		PCR2	p439s	GAGTWTACBTGYTGCCGCGCAG	p1As	ATRTACCCCATGAGRTCAGGC	312
Pan-GT	NS5B _{GT}	PCR1	sv360s & sv361s	CTTCTCATATGACACCCGCTGYTTYGA CTTCTCATATGACACCCGWTGCTTYGA	sv542as	GGAGGGGCGGAATACCTGGTCATRGYTCGTRAA	397
		PCR2	sv362s & sv363s	CATATGACACCCGCTGYTTYGACTC CATATGACACCCGWTGCTTYGAYTC	sv542as	GGAGGGGCGGAATACCTGGTCATRGYTCGTRAA	394
GT1a	NS3	PCR1	HCV1a_3a-F	ATGTGGCCTCTCCTCTGC	HCV1a_4a-R	TCTCCGGTGGTGACAGAGC	1719
		PCR2	HCV1a_3b-F	TGGRTTCCCCCTCAACG	HCV1a_3e-R	ATCCGTGGAGTGGCACTCG	1370
	NS5A	PCR1	HCV1a_5c-F	TGAGCGGTGAGGTCCCTCC	HCV1a_5e-R	GAGGGATCAGTGAGCATGG	912
		PCR2	HCV1a_5d-F	TGGGACTGGATATGCGAGG	HCV1a_5d-R	GTGAAAATTTCGGCGATGG	408
	NS5B	PCR1	HCV1a+b-7527-F	AYCCIGATCTCAGCGACGGRTC	HCV1a_7e-R_int	CCTGCAGCAAGCAGGAGTAGGC	1772
		PCR2	HCV1a+b-7587-F	GAYTCGTSTGCTGCTCRATGTC	HCV1a_7e-R_int	CCTGCAGCAAGCAGGAGTAGGC	1712
GT1b	NS3	PCR1	HCV1b_3b-F	GCCCGCATGCCATCATCC	HCV1b_4a-R	CACGACRAGCCGCGCTCC	1693
		PCR2	HCV1b_3c-F	TTGCGGTGGCAGHAGAGC	HCV1b_4b-R	CATTAGAGCGTCTGTTGC	940
	NS5A	PCR1	HCV1b_5c-F	ATAGGCCTTGGGAAGGTGC	HCV1b_6a-R	ATGTTYCCGCCCATCTCCTGCCG	1176
		PCR2	HCV1b_5d-F	CCCCACGCACTATGTGCC	HCV1b_5e-R	AGGGGTGCGTRAGCATGG	728
	NS5B	PCR1	HCV1a+b-7527-F	AYCCIGATCTCAGCGACGGRTC	HCV1b_7e-R	GGGGAGCAGGTAGATGCC	1829
		PCR2	HCV1a+b-7587-F	GAYTCGTSTGCTGCTCRATGTC	GT1b_9325-R	CCYACRAGRAGTAGGAGTAGGC	1738
GT2	NS5A	PCR1	GT2-6075-F	GCGGTCCARTGGATGAAYAGRCT	GT2a-7038-R & GT2b-7038-R	GT2a-7038-R: GCATCCACCATGTCCACYTCAT GT2b-7038-R: GCATCCACCATGTCCACYTCAT	963
		PCR2	GT2-6102 -F	GCCTTYGCTCCAGAGGAAACCA	GT2-6816-R	TCAGGTRCARGGRAGCTG	714
	NS5B	PCR1	GT2-7497-F	TCCTCCATGCCYCCCTYAG	sv542as	GGAGGGGCGGAATACCTGGTCATRGYTCGTRAA	1119
		PCR2	GT2-7599-F	TGCTCYATGTCATACTCCTGGAC	sv542as	GGAGGGGCGGAATACCTGGTCATRGYTCGTRAA	1017
GT3	NS5A	PCR1	(+)-GT3a-5145	CCRAGYTGAGCAGAGAYTGGA	(-)-GT3a-7544	ATGCCCGGCTCYCCCTCGA	2399
		PCR2	(+)-GT3a-5275	TCATGGYATGCATGTCAGCYGA	(-)-GT3a-7444	GTGTGTCRACCCCRGAGGATGA	2169
	NS5B	PCR1	HCV3a-6840-F	GATGTBTCTGTGCTGACCTCGATG	HCV3a-9276-R	CACGYGACACGCTGTGATAAATGTC	2436
		PCR2	GT3a-7283-F	ACCACCAACTGTCATGG	HCV3a-9171-R	GTACGCCCAATTRAAGAGRTA	1888
GT4	NS3	PCR1	(+)-HCV4-3264	RTRTTYACRSCYATGGAGAAG	(-)-HCV4-4275	GARTGGCAYTCRCCACARATGATRAT	1011
		PCR2	(+)-HCV4-3364	ATGAGATMYTGCTGGRCCRGC	(-)-HCV4-4275	GARTGGCAYTCRCCACARATGATRAT	911
	NS5A	PCR1	(+)-GT4-5937-F	TTYAARATCATGAGYGGYGA	(-)-GT4d-6677-R	ACCTGGCAGGGRCCTTGAT	780
		PCR2	(+)-GT4-6069-F	GAGGGRCRGTYCAGTGGATGAA	(-)-GT4d-6674-R	CAGGGGCACCTTGATGTRTC	645
	NS5B	PCR1	HCV4-7933-F	ATCCCGCAAGGCCRTTAACCA	GTx-9276-R	CAYGAGACAIGCTGTGATARATGTC	1343
		PCR2	HCV4-7948-F	TTAACCACATCARCTCCGTGTGG	HCV4-9269-R	GCTGTGATAAATGTYCCCCCG	1321

Tabelle 6: Übersicht über die Primer-Kombinationen der verwendeten Nested-PCRs.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es Nukleinsäuren der Größe nach aufzutrennen. Zu 0,5 g Agarose werden dazu 50 mL 1%-TBE-Puffer hinzugegeben und diese zwei Mal 1 Min. lang bei 700 W aufgeköcht bis eine reine Lösung entsteht. Daraufhin werden vier Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wird in eine Gelelektrophoresewanne gegossen und härtet für 20 Min. bei Raumtemperatur oder für 10 Min. bei -20 °C aus.

Das erstarrte Gel wird dann mit TBE-Puffer übergossen, sodass es vollständig bedeckt ist. Als nächstes werden 5 µL Marker in eine der äußeren Geltaschen pipettiert. Danach werden die anderen Geltaschen mit ebenfalls jeweils 5 µL PCR-Produkt gemischt mit 5x Ladepuffer (NEB) befüllt.

Die Gelelektrophoresewanne wird an eine Spannungsquelle angeschlossen, mit der für 60 Min. eine Spannung von 120 V mit bis zu 400 W über das Gel gelegt. Die negativ geladene DNA aus dem PCR-Produkt wandert dabei je nach Größe der Fragmente mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung des positiven Pols. Kurze Fragmente können besser durch das Gel wandern und werden somit schneller bewegt als große Fragmente.

Zur Auswertung des Gels wird es mit UV-Licht bestrahlt. Daraufhin wird eine Photographie angefertigt, auf der die Lichtemission des Ethidiumbromids sichtbar wird. Da sich Ethidiumbromid in DNA einlagert, sind Ansammlungen von DNA-Fragmenten mit gleicher Länge als Bande im Gel zu erkennen. Die entsprechende Größe der Fragmente einer Bande kann anhand der Höhe der einzelnen Banden im Verhältnis zu den Markerbanden mit vorbeschriebenen Fragmentlängen abgeschätzt werden.

2.2.5 DNA-Aufreinigung

Eine Aufreinigung der amplifizierten DNA erfolgt vor der Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte. Die Aufreinigung wird mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ von Qiagen durchgeführt. Zunächst wird eine Filtersäule in einem Auffangbehälter platziert. Es werden 450 µL alkoholischer Puffer „Buffer PB“ auf die Filtersäule aufgebracht und 50 µL PCR-Produkt mit der darin enthaltenen aufzureinigenden DNA hinzugefügt. Die Probe wird für 30 Sek. mit 13.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, sodass das Gemisch durch die Filtersäule gedrückt wird und die DNA am Filter haften bleibt. Der Überstand wird abgegossen und die Filtersäule erneut im Auffangbehälter platziert. Nach Hinzugabe von 750 µL Buffer PE zur Reinigung der am Filter gebundene DNA, wird die Probe zweimal für 1 Min. bei 13.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Dabei wird der Überstand jeweils anschließend

abgegossen, um den Filter wieder vollständig vom alkoholischen Puffer zu befreien. Als nächstes wird die Filtersäule in ein frisches Behältnis gestellt, das dem Auffangen der gereinigten DNA dient. Nach 1 Min. Inkubationzeit mit 50 µL Buffer EB wird die DNA mittels Zentrifugation für 1 Min. mit 13.000 Umdrehungen/Min. vom Filter gelöst. Die Filtersäule wird anschließend verworfen. Das im Auffangbehältnis vorhandene Produkt enthält die aufgereinigte DNA.

2.2.6 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nukleinsäure-Konzentrationen aufgereinigter DNA-Proben wurden photometrisch mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 von Thermo Scientific™ bestimmt. Mittels der Konzentrationsmessung kann ermittelt werden, ob eine für die Sequenzierung ausreichende Menge der aufgereinigten DNA (300 ng) in der entsprechenden Probe vorhanden ist.

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch LGC Genomics GmbH in Berlin Deutschland bzw. Eurofins durchgeführt. Das angewandte Verfahren beruht auf der Didesoxymethode nach Sanger.

2.2.8 Sequenzanalyse

Sequenzanalysen sowie die Darstellung der Genomsequenzen von Interesse und deren Bereitstellung für den Abgleich mit HCV-Datenbanken zur Genotypisierung und Resistenzbestimmung wurden mit der Software Geneious® 10.2.2 von Biomatters ltd. aus Neuseeland durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die RT-Reaktion ist der kostenaufwändigste und stör anfälligste Schritt bei der Genotypisierung und Resistenztestung des HC-Virus. Ein universeller RT-Ansatz mit dem Ergebnis eines vollständig in cDNA umgeschriebenen Virus-Genoms scheint daher sinnvoll, wenn es dadurch gelingt, alle sich anschließenden Testungen von diesem RT-Produkt ausgehend durchzuführen. DNA ist deutlich stabiler als RNA und damit besser zu lagern. Somit könnte eine vollständig in cDNA umgeschriebene Kopie des Virusgenoms immer wieder als Ausgangspunkt für alle weiteren Testungen mittels PCR dienen. Weitere RT-Reaktionen ausgehend von der HCV-RNA wären dann nicht mehr erforderlich. Die daraus resultierende Fragestellung ist folglich, wie es gelingen kann, das gesamte in RNA vorliegende HCV-Genom in cDNA umzuschreiben.

3.1 Zwei Primer in einer RT-Reaktion (p874A und SV542as)

Zur Annäherung an die Transkription eines vollständigen HCV-RNA-Moleküls in DNA sollten zuerst mehrere, verschiedene Abschnitte des HCV-Genoms gleichzeitig, d.h. von einem gemeinsamen RT-Produkt ausgehend, amplifiziert werden. Durch das Zusammenfassen der RT-Reaktionen mehrerer HCV-Sequenzierungsprotokolle und die Verwendung desselben RT-Produkts als Ausgangspunkt für alle sich anschließenden PCR-Protokolle könnten zusätzliche RT-Reaktionen eingespart werden. Besonderes Interesse bestand darin herauszufinden, ob es generell möglich ist, zwei verschiedene Primer zu der gleichen RT-Reaktion hinzuzugeben ohne dass sich die Primer gegenseitig inhibieren. Die dazu verwendeten Reverse-Primer SV542as und p874A binden in unterschiedlichen Bereichen des Virusgenoms (NS5B u. Core). Mittels einer gemeinsamen RT-Reaktion sollten zwei voneinander unabhängige RNA-Abschnitte zeitgleich in cDNA umgeschrieben werden. Die daraus amplifizierten Genomabschnitte Core_{GT} und NS5B_{GT} wurden gewählt, da sie die beiden in der Routinediagnostik zur Genotypisierung verwendeten Bereiche des HCV-Genoms darstellen [70]. Core_{GT} ist in der Nähe des 5'-Endes lokalisiert, wohingegen NS5B_{GT} nahe des 3'-Endes des HCV-Genoms liegt (s. Abb. 6).

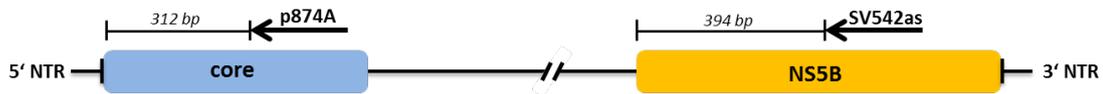


Abb. 6: Ansatzstellen der RT-Primer (p874A und SV542as) an der HCV-RNA und Lage der amplifizierten DNA-Abschnitte. Das Virusgenom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Core (blau) und NS5B (gelb) markieren die entsprechende Lage der Genomabschnitte im HCV-Genom. Die dickgedruckten Pfeile stellen die Reverse-Primer der RT-Reaktion, sowie deren Ausrichtung und Ansatzstellen am Virusgenom dar. Die sich den Pfeilspitzen anschließenden Intervalle beschreiben die Länge der mittels PCR amplifizierten Fragmente sowie ihre Zuordnung hinsichtlich des HCV-Genoms.

Im Folgenden wurde die aus vier Patientenproben extrahierte RNA untersucht. Nach der Durchführung der RT-Reaktion wurde die im RT-Produkt enthaltene cDNA jeweils in zwei unabhängige *Nested*-PCRs, für Core_{GT} und für NS5B_{GT}, überführt. Eine positive Amplifikation in der PCR wurde mittels Gelelektrophorese dargestellt und diente als Nachweis für eine erfolgreiche Reverse Transkription der entsprechenden HCV-RNA-Bereiche (s. Abb. 7).

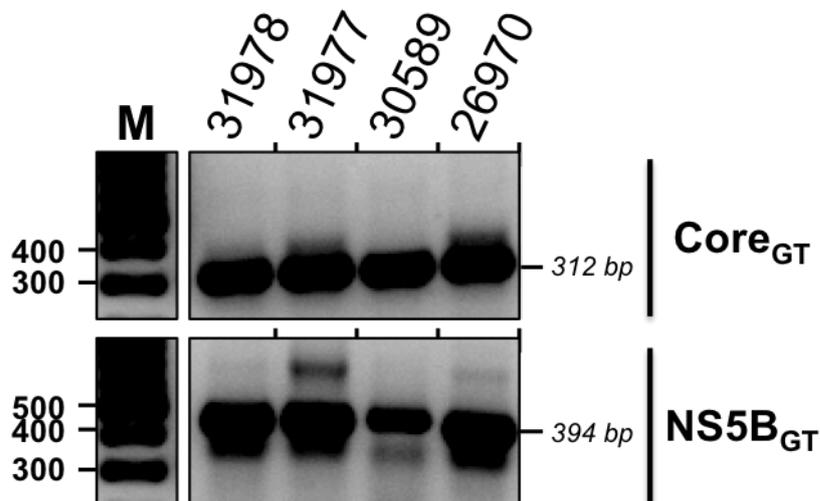


Abb. 7: Nachweis der Amplifikation zweier unabhängiger HCV-Genomabschnitte ausgehend von einer gemeinsamen RT-Reaktion mit zwei verschiedenen Reverse-Primern. Je 5 μ L RNA-Eluat wurden in einem 20 μ L-Ansatz in cDNA transkribiert und die entsprechenden Bereiche anschließend mittels *Nested*-PCR amplifiziert. Die Ansätze sowie 1 μ L 100 bp DNA-Leiter (peqlab) wurden jeweils auf einem 1%-igen Agarosegel mit 0,5 μ g/mL Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Detektion der DNA erfolgte mit UV-Licht. Das Bild wurde mit einem Gel-Dokumentationssystem aufgenommen. Die in der RT-Reaktion verwendeten Reverse-Primer waren p874A und SV542as, welche in den für die Genotypisierung (GT) verwendeten Regionen des HCV-Genoms, Core und NS5B, ansetzen. Die fünf-stelligen Nummern sind verschlüsselte Patienten-Identifikationsnummern. Die Gelelektrophorese zeigt Banden bestehend aus DNA-Fragmenten mit einer Länge von 312 bp (Core_{GT}-PCR) bzw. 394 bp (NS5B_{GT}-PCR) für vier verschiedene Patientenproben. Alle Banden sind als positiv zu werten.

bp: Basenpaare; GT: Genotypisierung; M: Markerbanden

In der Gelelektrophorese der NS5B_{GT}-PCR sind vier Banden auf Höhe des 400 bp Markers sichtbar, bei denen es sich um das 394-bp-große PCR-Produkt aus dem NS5B-Abschnitt handelt. Sie sind für alle Proben positiv. Der Abschnitt ist somit wahrscheinlich durch die Reverse Transkriptase ausgehend vom Primer SV542as, der im NS5B-Abschnitt bindet, in cDNA umgeschrieben worden. Bei der Core_{GT}-PCR sind vier Banden knapp oberhalb des 300-bp-Markers zu sehen, bei denen es sich um das 312-bp-große Core_{GT}-PCR-Produkt handelt. Bei allen vier Patientenproben ist es demnach gelungen in einer RT-Reaktion zwei unabhängige RNA-Abschnitte gleichzeitig in cDNA umzuschreiben (s. Abb. 7).

Es ist demnach anzunehmen, dass die Reverse Transkriptase sowohl ausgehend vom NS5B_{GT}-Primer (SV542as) als auch vom Core_{GT}-Primer (p874A), HCV-RNA in cDNA transkribiert hat. Eine andere Erklärung wäre jedoch, dass die RT-Reaktion, die von SV542as ausgegangen ist, bis über die später in der Core_{GT}-PCR amplifizierte Region weitergelaufen ist. In diesem Falle wäre die cDNA des Core-Abschnitts ausgehend vom Reverse-Primer SV542as in der NS5B-Region transkribiert worden. Dabei würde mit den dazwischenliegenden anderen Genomabschnitten eine cDNA entstehen, die fast das vollständige Virusgenom beschreibt. Diese Hypothese soll im Folgenden weiter untersucht werden.

Bislang konnte bereits gezeigt werden, dass ein RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (SV542as und p874A) in einer RT-Reaktion durchführbar ist, und dass in einer RT-Reaktion verschiedene Genomabschnitte einer HCV-Patientenprobe in cDNA transkribiert werden können. Diese cDNA kann daraufhin als Template für die Amplifikationen zweier unabhängiger Genomabschnitte mittels PCR dienen.

3.2 Das komplette HCV-Genom kann in cDNA umgeschrieben werden (SV542as)

Nachdem es gelungen war, zwei RT-Primer zur Amplifikation verschiedener Genomabschnitte gleichzeitig in einer RT-Reaktion zu verwenden, sollte als Nächstes die tatsächliche Länge des von der Reversen Transkriptase umgeschriebenen cDNA-Fragments untersucht werden. Bisher war man davon ausgegangen, dass sich nur kurze RNA-Abschnitte (<2000 bp) in cDNA umschreiben lassen [71]. In der Tat sind Taq-PCR-Produkte auf eine maximale Länge von 2500 bp beschränkt. Diese Limitation wird jedoch auf die Aktivität der Taq-Polymerase zurückgeführt, welche bei der Reversen Transkription nicht zum Einsatz kommt.

Im Folgenden wurde der RT-Primer SV542as, welcher im hinteren NS5B-Abschnitt zum 3'-Ende hin ansetzt (s. Abb. 8), als einziger Reverse-Primer zur RT-Reaktion hinzugegeben. Die Länge der cDNA wurde dann mittels Amplifikation kurzer über das gesamte HCV-Genom verteilter PCR-Fragmente abgeschätzt. Die NS5B_{GT}-PCR diente als

3.3 Anwendbarkeit bei verschiedenen Virus-RNA-Konzentrationen (SV542as)

3.3.1 Patientenproben mit verschiedenen HCV-RNA-Konzentrationen

Nachdem es erfolgreich gelungen war, HCV-RNA ausgehend vom NS5B_{GT}-Primer (SV542as) bis zur Core-Region mit nur einer RT-Reaktion in cDNA umzuschreiben, sollte im Weiteren untersucht werden, ob die Effizienz und die Länge der cDNA-Synthese während der RT-Reaktion von der Viruslast des Patienten abhängig ist. Dazu wurden sieben Patientenproben des Genotyps 1a mit Viruslasten von 200.000 IU/ μ L bis 10 Mio. IU/ μ L mit dem NS5B_{GT}-Primer (SV542as) in cDNA umgeschrieben und sowohl die Core_{GT}- als auch die NS5B_{GT}-Region mittels PCR amplifiziert (s. Abb. 9).

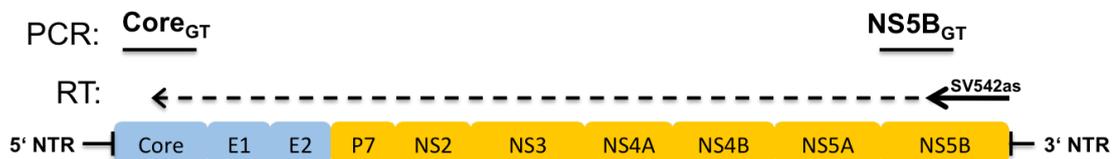


Abb. 9: **Ansatz des Reverse-Primers SV542as am HCV-Genom sowie Lokalisation der mit Core_{GT}- und NS5B_{GT}-PCR amplifizierten Abschnitte.** Das HCV-Virusgenom ist schematisch vom 5'- bis zum 3'-Ende dargestellt (vgl. Abb. 1) und nach Genomabschnitten unterteilt (Strukturproteine – blau, Nicht-Strukturproteine – gelb). Der dickgedruckte Pfeil zeigt die Ansatzstelle und Richtung des RT-Primers (SV542as). Der gestrichelte Pfeil stellt die transkribierte cDNA dar. Die mittels PCR amplifizierten Fragmente für die Genotypisierung (GT), Core_{GT} und NS5B_{GT}, sind in Bezug auf das HCV-Genom dargestellt.

Die Gelelektrophorese zeigt, dass alle PCRs positiv waren und damit die cDNA-Synthese in allen Fällen abgelaufen ist. Es konnte demnach keine Abhängigkeit von der Viruslast festgestellt werden. Das Ergebnis gab einen ersten Anhalt dafür, dass schon niedrige Viruslasten (200.000 IU/ml) ausreichen können, um große Bereiche des HCV-Genoms mittels Reverser Transkription in eine zusammenhängende cDNA umzuschreiben (Abb. 10).

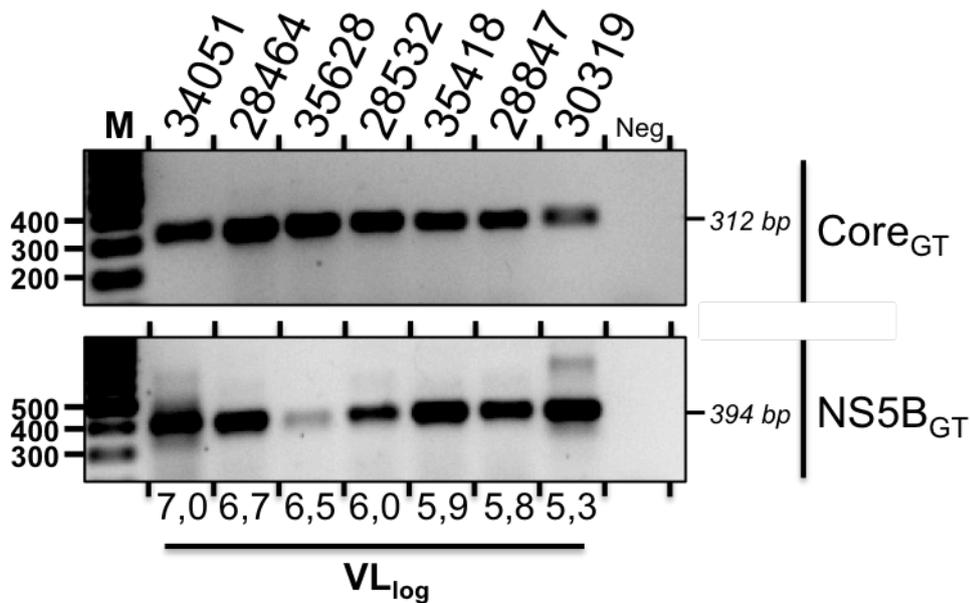


Abb. 10: **Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} aus HCV-Proben mit verschiedenen Viruslasten nach RT-Reaktion mit SV542as.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Als Reverse-Primer der RT-Reaktion wurde SV542as verwendet. Die cDNA wurde für jeden Ansatz in eine Core_{GT}-PCR und eine NS5B_{GT}-PCR überführt. Die Patientenproben wurden nach absteigenden Viruslasten (VL) sortiert. Die Viruslasten sind logarithmisch dargestellt und lagen zwischen 10 Mio. und 200.000 IU/mL. Sowohl die Core_{GT}-PCR als auch die NS5B_{GT}-PCR weisen positive Banden für alle Proben auf.

3.3.2 Verdünnungsreihe einer HCV-RNA-Probe

Zur noch exakteren Bestimmung der niedrigsten Viruslast, bei der eine für die Diagnostik verwertbare Menge an DNA-Abschnitten produzierbar ist, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Die HCV-RNA einer hochvirämischen Probe mit einer ermittelten Viruslast von 10 Mio. IU/mL (= 10^7 IU/mL) wurde in sechs Schritten immer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die niedrigste erzeugte Viruslast lag somit bei errechneten 10 IU/mL.

Die einzelnen Proben der Verdünnungsreihe wurden daraufhin mit dem Reverse-Primer SV542as als alleinigem Ausgangspunkt für die Reverse Transkription in RT-Reaktionen überführt. Nachfolgend wurde jeweils eine *Nested*-PCR für den NS5B_{GT}- sowie den Core_{GT}-Abschnitt durchgeführt (s. Abb. 9).

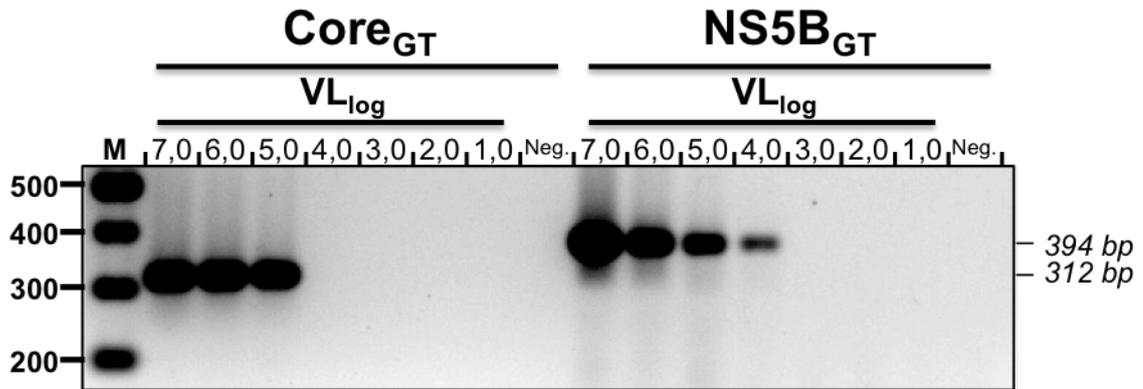


Abb. 11: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} aus einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der niedrigsten für die Genotypisierung verwendbaren Viruslast. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. SV542as diente als alleiniger RT-Primer. Es wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Viruslast (VL) von 10⁷ IU/mL angefertigt. Die cDNA wurde für jede entstandene Viruslast einzeln mittels RT-Reaktion transkribiert und die cDNA-Synthese mittels einer Core_{GT}-PCR und einer NS5B_{GT}-PCR überprüft. Die Viruslasten sind logarithmisch angegeben. Der Core_{GT}-Abschnitt ließ sich absteigend bis zu einer Konzentration von 10⁵ IU/mL amplifizieren, der NS5B_{GT}-Abschnitt bis zu einer Konzentration von 10⁴ IU/mL.

Für das NS5B_{GT}-Fragment sind absteigend kräftige Banden bis zu einer verdünnten Viruslast von 10.000 IU/mL (= 10⁴ IU/mL) zu erkennen. Das Core_{GT}-Fragment lässt sich bis zu einer Verdünnung von 100.000 IU/mL (= 10⁵ IU/mL) mittels *Nested*-PCR amplifizieren (s. Abb. 11).

Eine Genotypisierung wäre demnach schon ab 10.000 IU/mL mit Sequenzanalyse des NS5B_{GT}-Fragments durchführbar und eine Sequenzierung beider Abschnitte, also NS5B_{GT} und Core_{GT}, ab einer Viruslast von 100.000 IU/μL. Erfahrungsgemäß weisen Patienten jedoch meist deutlich höhere Viruslasten auf, sodass eine erfolgreiche Durchführung der RT-Reaktion mit diesem Ansatz bei den meisten Proben anzunehmen ist.

3.4 Genotypunabhängige Reverse Transkription des kompletten HCV-Genoms (SV542as)

Es konnte bereits gezeigt werden, dass üblicherweise in Patientenproben vorkommende Viruslasten ausreichen, um das komplette RNA-Genom des HC-Virus in cDNA umzuschreiben. Da dies jedoch bisher ausschließlich für den Genotyp 1a gezeigt wurde, sollte als Nächstes untersucht werden, ob der beschriebene RT-Ansatz mit nur einem Reverse-Primer (SV542as) in der RT-Reaktion (s. Abb. 9) auch bei andere Genotypen in gleicher Weise angewandt werden kann. Dazu wurden Proben von sieben verschiedenen Patienten mit den Genotypen 1a, 1b, 2b, 3a, 4d und 4 verwendet.

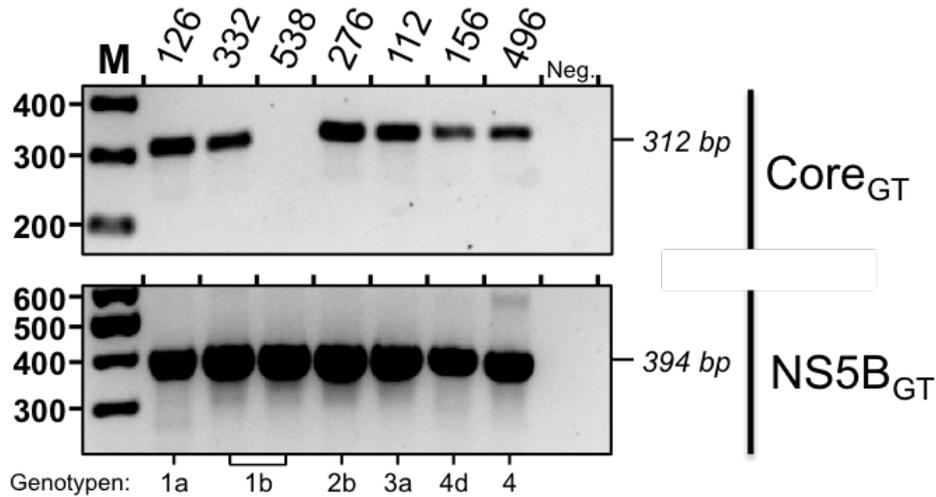


Abb. 12: **Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} bei verschiedenen Genotypen nach Transkription mit einem alleinigen Reverse-Primer (SV542as) in der RT-Reaktion.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. HCV-RNA von Patienten, die mit unterschiedlichen HCV-Genotypen infiziert waren, wurde mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Als Reverse-Primer diente SV542as. Die Effizienz der cDNA-Synthese wurde mittels einer Core_{GT}-PCR und einer NS5B_{GT}-PCR überprüft. Für NS5B_{GT} ließen sich bei allen Genotypen positive Banden darstellen. Core_{GT} konnte ebenfalls bei allen Genotypen amplifiziert werden. (Das positive Ergebnis des RT-Ansatzes 538 nach wiederholter Core_{GT}-PCR ist nicht dargestellt.)

Die Gelelektrophorese der vom NS5B_{GT}-Abschnitt amplifizierten DNA-Fragmente zeigt für alle Patientenproben eine Bande in etwa auf Höhe der 400-bp-großen Markerbande, sodass mit den errechneten 394 bp des NS5B_{GT}-Fragmentes davon auszugehen ist, dass der angestrebte Bereich zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert werden konnte. Demnach war die Reverse Transkription bei allen Ansätzen erfolgreich und ist mindestens bis über den NS5B-Abschnitt abgelaufen.

Für die Core_{GT}-PCR konnte ein ähnliches Bild gezeigt werden. Die zunächst negative Probe 538 konnte bei einer Wiederholung der Core_{GT}-PCR ebenfalls amplifiziert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich um ein Problem bei der experimentellen Durchführung der PCR handelte. Alle Banden liegen etwas höher als die 300-bp-Markerbande und entsprechen damit der errechneten Basenpaarlänge von 312 bp für das Core_{GT}-Fragment (s. Abb. 12).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Transkription des kompletten HCV-Genoms in cDNA genotypübergreifend möglich ist.

3.5 Universeller HCV-Testansatz (SV542as, p874As, und x-tail) – Teil 1: Genotypisierung

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass mit dem Reverse-Primer SV452as nahezu das komplette HCV-Genom in cDNA umgeschrieben werden kann. Allerdings bindet dieser Primer in der Mitte des NS5B-Abschnitts, welcher für das NS5B-Protein, eine Polymerase, kodiert. Daher wird bei der Reversen Transkription ausgehend von SV452as ein Teil des NS5B-Abschnitts nicht in cDNA umgeschrieben (s. Abb. 13). Die Resistenzen für die (NS5B-)Polymerase-Inhibitoren sind jedoch über die gesamte NS5B-Region verteilt. Deshalb wird ein Reverse-Primer benötigt, welcher die Transkription der kompletten NS5B-Region initiiert. Um dies zu gewährleisten, sollte dieser Primer also idealerweise noch vor der NS5B-Region ansetzen, sodass der gesamte für die Resistenztestung benötigte NS5B-Abschnitt transkribiert wird. Im Folgenden wurde daher untersucht, welcher Reverse-Primer es ermöglicht, auch alle für die Resistenztestung relevanten Abschnitten des HCV-Genoms zu amplifizieren. Ziel war es hierbei, bei nur einer initialen RT-Reaktion zu bleiben, von deren cDNA-Produkt ausgehend alle weiteren Tests mittels PCR durchführbar sind.

Um alle relevanten Bereiche des Virusgenoms abzudecken, wurden neben dem bisherigen Reverse-Primer (SV542as) zwei weitere Reverse-Primer (p874As und 9560-R (x-tail)) zur RT-Reaktion hinzugegeben. p874As ist der für die Core_{GT}-PCR verwendete Reverse-Primer. Für ihn konnte bereits gezeigt werden, dass es zu keiner bedeutenden gegenseitigen Behinderung mit SV542as kommt (s. 3.1). p874As wurde hier zum Versuchsaufbau hinzugegeben, um auch bei niedrigen Viruslasten oder schlechter Qualität des RNA-Eluats (vgl. 3.3.2 Verdünnungsreihe) eine zuverlässige Genotypisierung mittels des Core_{GT}-Abschnittes zu gewährleisten. 9560-R (x-tail) ist ein ebenfalls universell auf alle Genotypen passender Reverse-Primer. Er setzt innerhalb der hochkonservierten 3'-NTR an und induziert somit auch die Transkription des bislang durch SV542as nicht umgeschriebenen Teils der NS5B-Region (s. Abb. 13).

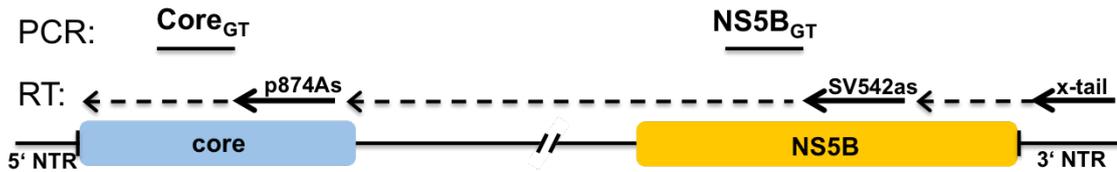


Abb. 13: Ansatzstellen der Reverse-Primer (p874As, SV542as und 9560-R (x-tail)) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente. Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Core (blau) und NS5B (gelb) markieren die entsprechende Lage der Genomabschnitte. Die dickgedruckten Pfeile stellen die Reverse-Primer der RT-Reaktion, sowie deren Ausrichtung und Ansatzstellen im HCV-Virusgenom dar. Die sich den Pfeilspitzen anschließenden gestrichelten Pfeile beschreiben die in der RT-Reaktion transkribierten Fragmente. Die durchgehenden Linien zeigen die Bereiche, die mit der Core_{GT}- bzw. der NS5B_{GT}-PCR amplifiziert und für die Genotypisierung (GT) verwendet werden.

Um den Einfluss des neu hinzugefügten Reverse-Primers 9560-R (x-tail) auf die cDNA-Synthese zu untersuchen, wurden vier Proben von unterschiedlichen Patienten mit den Genotypen 1a, 1b und 3a mit dem zuvor beschriebenen RT-Ansatz (Reverse Primer: 9560-R (x-tail), SV542as, p874As) transkribiert. Zur Ergebniskontrolle, ob die Reverse Transkription stattgefunden hat, wurde jeweils eine *Nested*-PCR für das NS5B_{GT}-Fragment sowie für das Core_{GT}-Fragment durchgeführt.

Alle vier Proben zeigen in der Gelelektrophorese Banden entsprechend der errechneten Fragmentlängen für beide Abschnitte (Core_{GT} und NS5B_{GT}) und sind somit als positiv zu werten (s. Abb. 14).

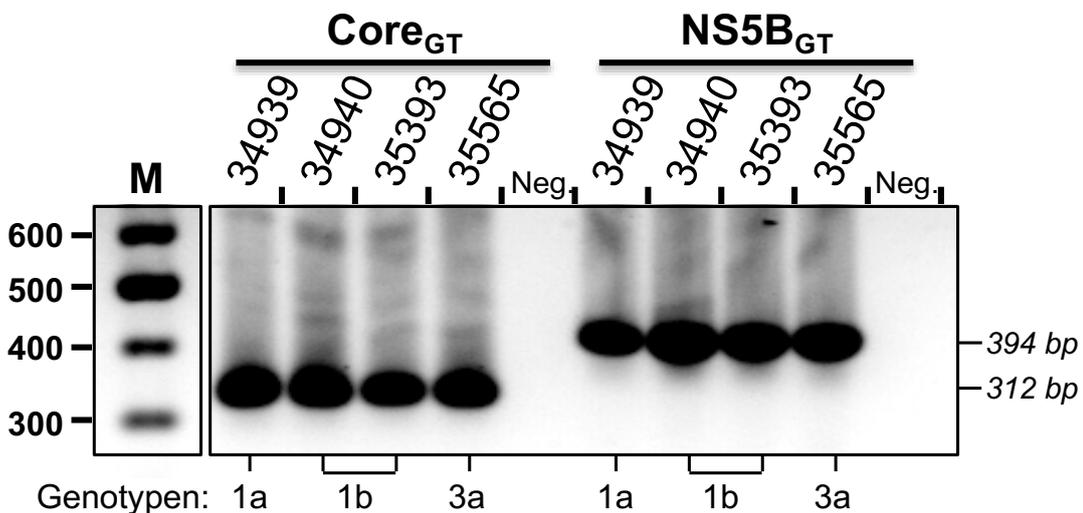


Abb. 14: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As). Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für alle vier Proben mit den Genotypen 1a, 1b und 3a wurde jeweils cDNA mittels einer RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As) transkribiert. Anschließend wurde die cDNA jeweils in eine Core_{GT}-PCR und eine NS5B_{GT}-PCR überführt. Alle Banden sind als positiv zu werten.

3.5.1 Klinische Anwendung in der HCV-Diagnostik

Die bis zu diesem Zeitpunkt getesteten Primer sollten zur Abschätzung ihrer Anwendbarkeit und ihres Potenzials in der Routinediagnostik in zwei unabhängigen Versuchen getestet werden. Zum einen wurde HCV-RNA vom Genotyp 4r zum anderen von HCV-Chimären aus den Genotypen 1b und 2k genotypisiert.

3.5.1.1 Genotypisierung seltener Genotypen (Genotyp 4r)

Zur Veranschaulichung der Anwendbarkeit des bis hierher neu entwickelten RT-Ansatzes bei der Genotypisierung von HCV-Patientenproben wurde das bislang erprobte Verfahren an zwei Patientenproben getestet. Diese waren mit der herkömmlichen Diagnostik bislang nicht eindeutig einem Genotyp zuzuordnen. Die RT-Reaktion wurde mit der Kombination aus den drei Reverse-Primern (9560-R (x-tail), SV542as und p87A4s) durchgeführt. Daraufhin folgte für beide Proben jeweils eine *Nested*-PCR sowohl des zur Genotypisierung verwendeten NS5B_{GT}- als auch des Core_{GT}-Fragments (vgl. 3.5, Abb. 13). In der Gelelektrophorese zeigen sich für beide Proben Banden, die zum einen das Core_{GT}- und zum anderen das NS5B_{GT}-Fragment darstellen. Die Länge des amplifizierten Bereichs für Core_{GT} beträgt errechnet 312 bp. Die repräsentierende Bande liegt auf Höhe des oberen Randes der 300-bp-großen Markerbande. Entsprechend findet sich die Bande für das NS5B_{GT}-Fragment mit einer errechneten Größe von 394 bp in etwa auf Höhe der 400-bp-Markerbande (s. Abb. 15).

Die DNA wurde daraufhin aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab für die eine Probe (Typ a) in beiden Abschnitten (Core_{GT} u. NS5B_{GT}) übereinstimmend den Genotyp 4r, für die andere Probe (421) ebenfalls übereinstimmend den Genotyp 1a.

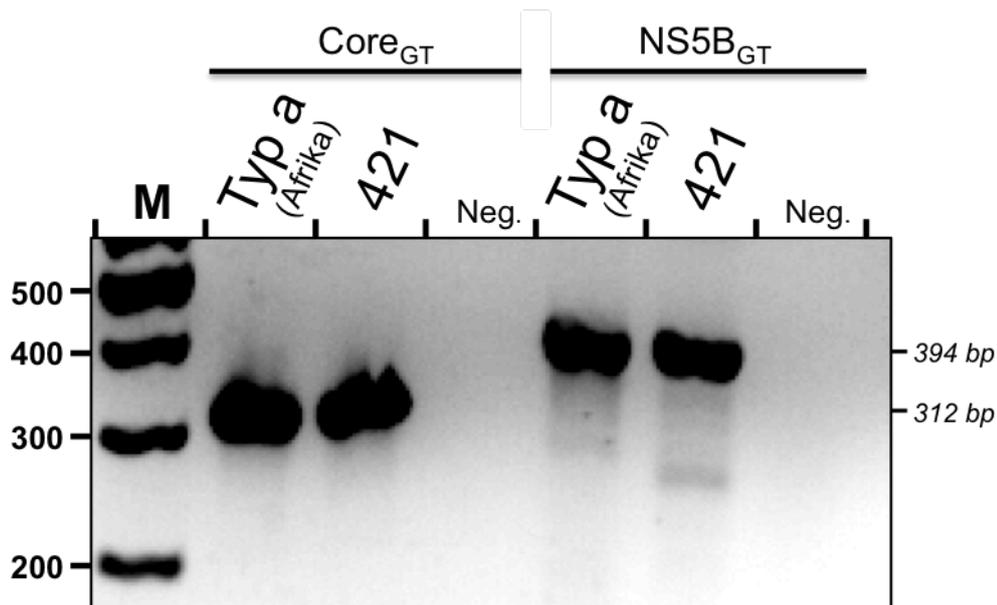


Abb. 15: **Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} ausgehend von einer gemeinsamen RT-Reaktion von zwei mit den bisher üblichen Verfahren nicht zu genotypisierenden Proben.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die mittels RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As) gewonnene cDNA wurde jeweils in eine Core_{GT}- und eine NS5B_{GT}-PCR überführt. Beide Proben zeigen positive Banden für beide Genomabschnitte. Die spätere Genotypisierung (GT) konnte Probe „Typ a“ mittels Sequenzanalyse beider Fragmente (Core_{GT} und NS5B_{GT}) dem Genotyp 4r und Probe „421“ dem Genotyp 1a zuordnen.

3.5.1.2 Genotypisierung von HCV-Chimären (Genotyp 2k/1b)

HCV-Chimären stellen einen Sonderfall bei der HCV-Genotypisierung dar. Im Folgenden sollten die Anwendbarkeit und die Vorteile, die ein einheitlicher RT-Ansatz bei der Genotypisierung solcher Sonderfälle bietet, veranschaulicht werden. Drei Patientenproben wurden hierzu mit dem bereits beschriebenen RT-Ansatz mit drei Reverse-Primern (9560-R (x-tail), SV542as und p87A4s) untersucht (vgl. 3.5, Abb. 13).

Diese Proben standen im Verdacht, HCV-Chimären zu sein, d.h. die Genotypisierung durch Core_{GT} und durch NS5B_{GT} liefert in diesen Fällen für die gleiche Probe unterschiedliche Ergebnisse. Dabei ergibt sich jeweils ein Genotyp 2k bei der Sequenzanalyse der Core_{GT}-Region und ein Genotyp 1b gemäß dem NS5B_{GT}-Fragment.

Eine solche Chimäre ist in Deutschland zwar selten, ihre Prävalenz wird jedoch möglicherweise durch unzureichende Diagnostik unterschätzt [72]. Ihre Entstehung geht vermutlich auf die Rekombination zwischen einem 2k- und einem 1b-Isolat zurück. Dabei stammt der eine Teil des Virusgenoms, der das 3'-Ende trägt von einem 1b-Genotyp. Der andere Teil, von NS3 bis zum 5'-Ende, geht auf einen 2k-Genotyp zurück [73]. Mit Hybridisierungsverfahren gelingt es bislang nicht diesen Genotyp korrekt zu bestimmen. Wird daraufhin ein Therapieschema gewählt, welches dem eigentlichen Subtyp nicht

entspricht, droht Therapieversagen, da mögliche Resistenzen oder mangelnde Medikamentenwirksamkeit nicht berücksichtigt werden können [66, 74].

Die drei zu untersuchenden Proben wurden mittels RT-Reaktion transkribiert und die gewonnene cDNA jeweils in eine Core_{GT}- sowie eine NS5B_{GT}-PCR überführt.

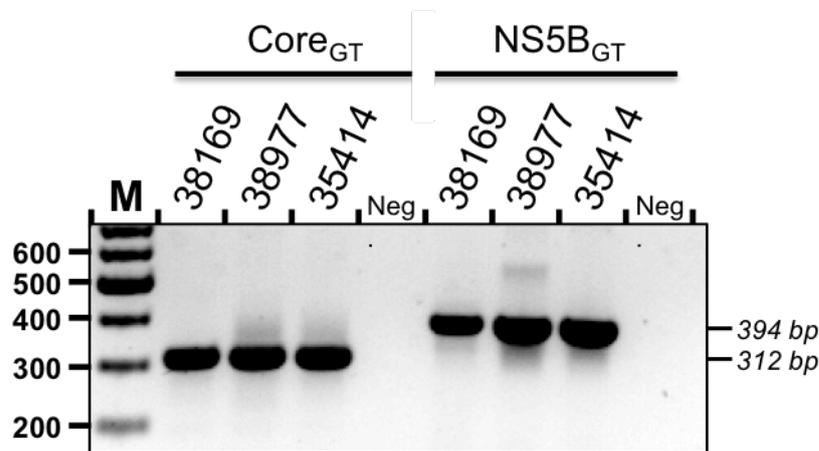


Abb. 16: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} ausgehend von jeweils einer gemeinsamen RT-Reaktion bei drei Proben mit HCV-Chimären vom Typ 2k/1b. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die für jede Probe mittels RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As) transkribierte cDNA wurde jeweils in eine Core_{GT}- und eine NS5B_{GT}-PCR überführt. Alle drei Proben zeigen positive Banden für beide Genomabschnitte (Core_{GT}: 312 bp; NS5B_{GT}: 394 bp). Die anschließende Genotypisierung konnte mittels Sequenzanalyse beider Fragmente alle drei Core_{GT}-Abschnitte dem Genotyp 2k zuordnen sowie alle drei NS5B_{GT}-Abschnitte dem Genotyp 1b.

In der Gelelektrophorese sind die jeweils passenden Banden zu sehen (Core_{GT}: 312 bp; NS5B_{GT}: 394 bp). Die DNA wurde aufgereinigt, sequenziert und mittels Sequenzanalyse genotypisiert. Für alle Core_{GT}-Abschnitte lautet das Ergebnis Genotyp 2k, für alle NS5B_{GT}-Abschnitte Genotyp 1b (s. Abb. 16).

Es konnte gezeigt werden, dass mit einem einheitlichen RT-Ansatz und Sequenzierung von Core_{GT} und NS5B_{GT} auch Chimären routinemäßig korrekt genotypisiert werden könnten. Bei alleiniger Genotypisierung durch Core_{GT} oder NS5B_{GT} bzw. durch ein Hybridisierungsverfahren würden sie fälschlicherweise dem Genotyp 2k oder 1b zugeordnet.

3.6 Universeller HCV-Testansatz (SV542as, p874As, und x-tail) – Teil 2: Resistenztestung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Reverse-Primer x-tail keinen negativen Einfluss auf die cDNA-Synthese für die Genotypisierung hat (vgl. 3.5), sollten nun PCR-Protokolle für die Resistenztestung mit dem gleichen RT-Ansatz getestet werden. Dazu wurden

verschiedene genotyp-spezifische *Nested*-PCRs der Bereiche NS5A und NS5B verwendet. NS5A und NS5B sind neben NS3 wichtig für die Resistenztestung, da sie für jene Proteine kodieren, welche die Zielstrukturen der DAA darstellen. Mögliche Mutationen, die Resistenzen bewirken, sind demnach innerhalb dieser Abschnitte zu suchen. Sie werden im Folgenden zur besseren Abgrenzung mit dem Zusatz RR für *Resistenzrelevante Region* als NS5A_{RR} und NS5B_{RR} bezeichnet (s. Abb. 17). Als Template wurde erneut das zuvor gewonnene RT-Produkt (cDNA) der vier Patientenproben verwendet (vgl. 3.5, Abb. 14).

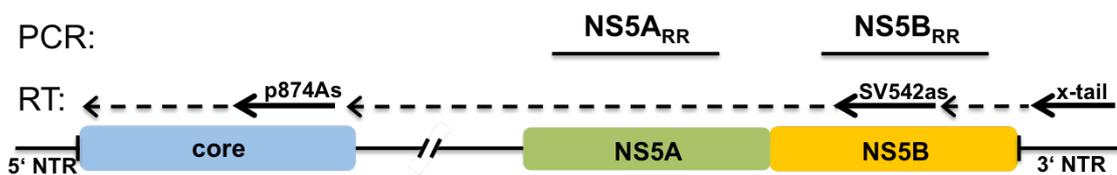


Abb. 17: Ansatzstellen der Reverse-Primer (p874As, SV542as und 9560-R (x-tail)) am HCV-Genom sowie die Lage zweier resistenzrelevanter Regionen. Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Core (blau), NS5A (grün) und NS5B (gelb) markieren die entsprechende Lage der Genomabschnitte. Die dickgedruckten Pfeile stellen die Reverse-Primer der RT-Reaktion, sowie deren Ausrichtung und Ansatzstellen im Virusgenom dar. Die sich den Pfeilspitzen anschließenden gestrichelten Pfeile beschreiben die Länge und Richtung der in der RT-Reaktion transkribierten Fragmente sowie ihre Zuordnung hinsichtlich der Genomabschnitte. NS5A_{RR} und NS5B_{RR} sind zwei mittels Nested-PCR amplifizierte Abschnitte für die Resistenztestung.

Die PCR-Produkte der NS5A- und NS5B-Resistenzprotokolle variieren je nach Genotyp in ihrer Größe. Dies liegt daran, dass die konservierten Bereiche der Primer-Bindungsstellen bei den einzelnen Genotypen nicht identisch sind und deshalb unterschiedliche Primer-Paare verwendet werden, die wiederum zu unterschiedlichen Längen der amplifizierten Abschnitte führen.

In der Gelelektrophorese der NS5A_{RR}-PCRs sind die vier Banden gemäß der Länge der darin enthaltenen Fragmente als positiv zu werten (s. Abb. 18).

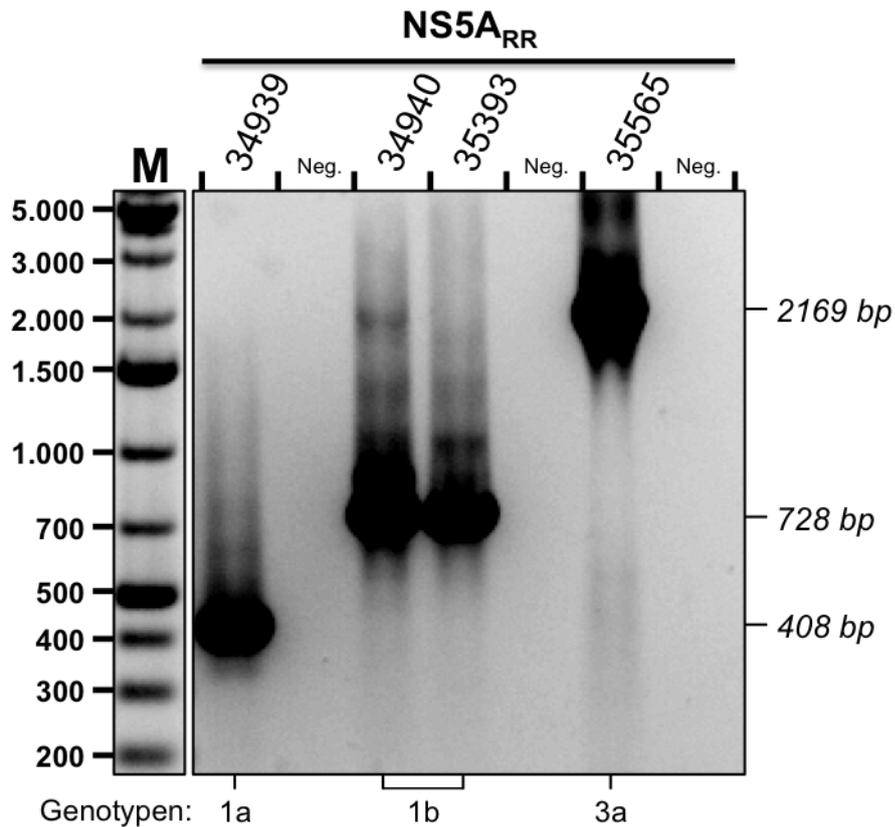


Abb. 18: Amplifikation des für die NS5A-Resistenzbestimmung relevanten Abschnitts (NS5A_{RR}) bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As). Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die zunächst mittels RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As) transkribierte cDNA wurde anschließend mit der jeweiligen genotypspezifischen NS5A_{RR}-PCR amplifiziert. Alle Banden sind als positiv zu werten.

In der Gelelektrophorese der NS5B_{RR}-PCRs ist bei der Probe 35565 vom Genotyp 3a eine kräftige Bande zu sehen und sie ist damit positiv. Die Probe 34940 vom Genotyp 1b ist ebenfalls als positiv zu werten. Die beiden anderen Proben sind negativ (s. Abb. 19).

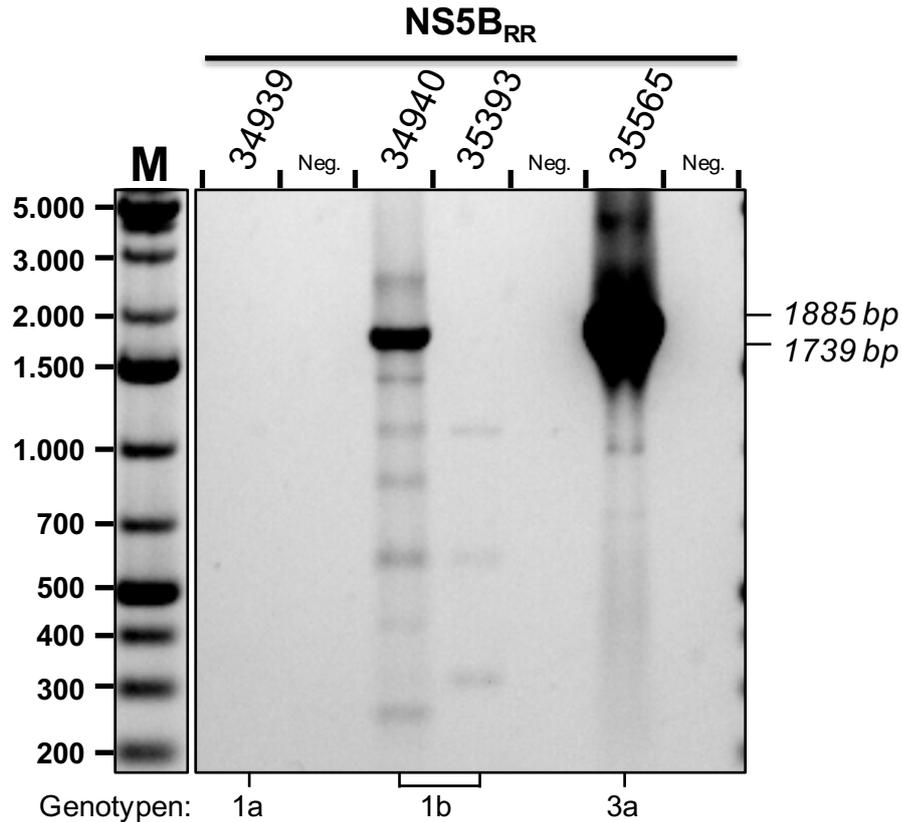


Abb. 19: Amplifikation des für die NS5B-Resistenzbestimmung relevanten Abschnitts (NS5B_{RR}) bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As). Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die zunächst mittels RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As) transkribierte cDNA wurde anschließend jeweils mit einer genotypspezifischen NS5B_{RR}-PCR amplifiziert. Die Probe 35565 vom Genotyp 3a zeigt eine kräftige Bande mit einer Fragmentlänge von 1885 bp und ist damit deutlich positiv. Die Probe 34940 vom Genotyp 1b mit einer Fragmentlänge von 1739 bp ist ebenfalls als positiv zu werten. Die beiden anderen Proben sind negativ. Das für die Resistenztestung verwendete Fragment für den Genotyp 1a hat eine Länge von 1712 bp.

Wie zuvor gezeigt, funktioniert die NS5A_{RR}-PCR in vier von vier Fällen (vgl. Abb. 18), die NS5B_{RR}-PCR jedoch nur in zwei von vier Fällen (vgl. Abb. 19). Neben zufälligen Störfaktoren oder schlecht bzw. nicht funktionierenden *Nested*-PCR-Ansätzen, besteht hier der Verdacht, dass die NS5B_{RR}-PCR deswegen nicht zuverlässig funktioniert, weil der zu transkribierende Bereich (NS5B) den Reverse-Primer SV542as miteinbezieht. Dies könnte zu einem Abbruch ebenjener cDNA-Stränge führen, welche durch den vorgelagerten Primer (9560-R (x-tail)) induziert werden. Das NS5B_{RR}-Fragment kann dann nicht in einem Stück amplifiziert werden, da keine zusammenhängende cDNA-Vorlage transkribiert wird. Im Folgenden wurden deshalb noch einmal verschiedene Reverse-Primer verglichen.

3.7 Austausch der Reverse-Primer (SV542as, Oligo d(A), und x-tail)

3.7.1 Effektivität von drei möglichen Reverse-Primern

Mit der Kombination aus drei Reverse-Primern (SV542as, x-tail und p874As) in der RT-Reaktion ließ sich bisher bereits cDNA synthetisieren, welche die Genotypisierung sicher zulässt. Für die Resistenztestung in der NS5B-Region (NS5B_{RR}) wird jedoch ein größerer Abschnitt benötigt als bei der Genotypisierung über NS5B (NS5B_{GT}). Da SV542as innerhalb dieses größeren NS5B-Abschnitts liegt, könnte jener ursächlich sein für einen Strangabbruch, auch wenn cDNA vom x-tail-Primer aus transkribiert wird. Deshalb sollte die Effektivität der beiden Primer (SV542as und x-tail) unabhängig voneinander getestet werden. Außerdem wurde der für alle Genotypen verwendbare Primer (Oligo d(A)) zum Versuchsaufbau hinzugefügt. Er setzt in der NTR-3'-Region des HCV-Genoms an, d.h. wie auch x-tail noch vor der NS5B-Region, und wurde bereits erfolgreich von Zhang et al. verwendet (s. Abb.20).

Es wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Probe vom Genotyp 1a mit einer Viruslast von 10⁶ IU/mL angelegt. Anschließend wurde für jeden Verdünnungsgrad jeweils ein RT-Ansatz für die Reverse-Primer SV542as, x-tail und Oligo d(A) durchgeführt. Daraufhin wurden die RT-Produkte jeweils in eine Core_{GT}- und eine NS5B_{GT}-PCR überführt.

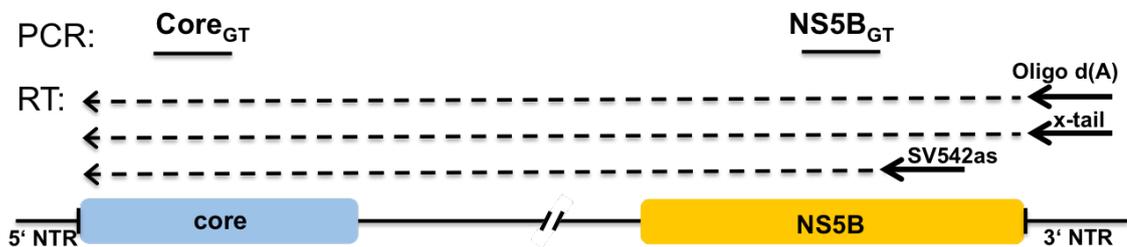


Abb. 20: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Oligo d(A), x-tail und SV542as) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente. Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Es sind drei alternative RT-Ansätze mit drei unterschiedlichen Reverse-Primern ((Oligo d(A), x-tail (9560-R) und SV542as) dargestellt. Die sich der RT-Reaktion anschließende Amplifikation des Core_{GT}- sowie des NS5B_{GT}-Fragments bestätigt die Reverse Transkription der HCV-RNA in cDNA.

Bei allen drei RT-Primern (SV542as, x-tail und Oligo d(A)) sind die Banden der Core_{GT}-PCR bis zu einer Verdünnung von 10⁴ IU/mL positiv. Bei der NS5B_{GT}-PCR ist x-tail positiv bis zu einer Viruslast von 10⁴ IU/ml, Sv542as bis zu 10³ IU/mL und Oligo d(A) bis zu 10² IU/mL (s. Abb. 21). Mit Oligo d(A) lassen sich demnach deutlich (zwei Zehnerpotenzen) niedrigere Viruslasten erfolgreich amplifizieren und genotypisieren als mit dem x-tail-Primer. Außerdem scheint auch die Effizienz hinsichtlich der Core-Region mit dem Reverse-Primer Oligo d(A) höher als mit dem x-tail-Primer (vgl. Bandenintensität in

Abb. 21). Demzufolge lässt sich unter Verwendung von Oligo d(A) als Reverse-Primer die höchste Erfolgsquote und Ergebnisstabilität bei der Amplifikation relevanter HCV-Genomabschnitte annehmen.

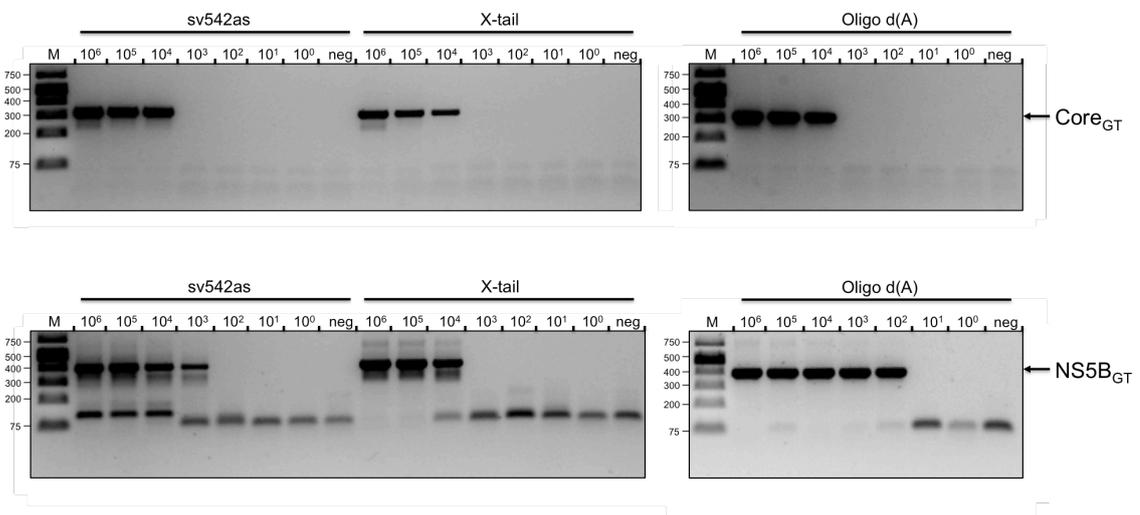


Abb. 21: **Verdünnungsreihen zum Vergleich der Effektivität verschiedener Reverse-Primer.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die angelegte Verdünnungsreihe wurde für jeden der Reverse-Primer SV542as, x-tail sowie Oligo d(A) durchgeführt. Zunächst wurde für jeden Primer separat und je Verdünnungsstufe eine RT-Reaktion angesetzt und anschließend die jeweilige cDNA mittels einer Core_{GT}- und einer NS5B_{GT}-PCR amplifiziert. Mit allen drei Reverse-Primern ließ sich der Core_{GT}-Abschnitt ab einer Konzentration von 10⁴ IU/mL und aufwärts amplifizieren. Der NS5B_{GT}-Abschnitt war mit x-tail in der RT-Reaktion ab 10⁴ IU/mL, mit SV542as ab 10³ IU/mL und mit Oligo d(A) ab 10² IU/mL und aufwärts für die Genotypisierung verwendbar.

3.7.2 RT-Ansatz mit Oligo d(A) und Core-Primer (p874as)

Bisher konnte die Amplifikation des Core_{GT}-Fragments mit dem Oligo d(A)-Primer bis zu einer Viruslast von 10⁴ IU/mL (vgl. Abb. 21) erfolgreich durchgeführt werden. Da der Core_{GT}-Abschnitt in der Routinediagnostik regelmäßig für die Genotypisierung herangezogen wird, sollte er grundsätzlich bei Patientenproben mit Viruslasten >10³ IU/mL sicher zu amplifizieren sein. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob die Sensitivität für die Amplifikation des Core_{GT}-Abschnitts weiter erhöht werden kann. Dazu wurde ein RT-Ansatz mit einer Kombination aus Oligo d(A) und Core-Primer (p874as) in einer Verdünnungsreihe getestet (s. Abb. 22).

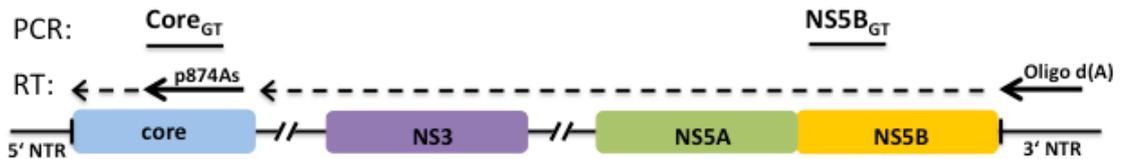


Abb. 22: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Core (p874As) und Oligo d(A)) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente. Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Es ist ein RT-Ansatz mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874As) dargestellt. Die Amplifikation von Core_{GT} sowie NS5B_{GT} dient als Erfolgskontrolle und zeigt an, ob die HCV-RNA zuvor in cDNA transkribiert wurde.

Wie in Abb. 23 zu sehen, ist die Core_{GT}-PCR bis zu einer Verdünnung von 10³ IU/mL positiv. Damit ist der Kombinationsansatz (Oligo d(A) + p874As) für Core_{GT} eine Zehnerpotenz sensitiver als der RT-Ansatz ohne p874As (vgl. Abb. 21 und Abb. 23). NS5B_{GT} ist weiterhin, wie schon bei dem RT-Ansatz mit Oligo d(A) als alleinigem Reverse-Primer, bis zu einer Verdünnung von 10² IU/mL positiv.

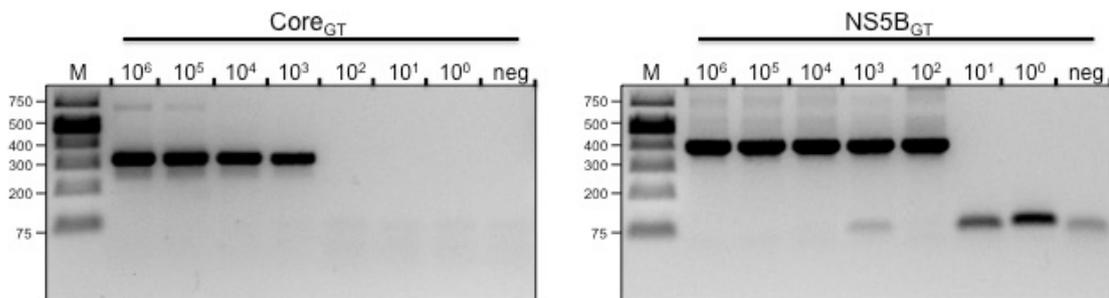


Abb. 23: Verdünnungsreihe zur Testung der Effektivität eines kombinierten RT-Ansatzes mit Oligo d(A) und Core (p874as) als Reverse-Primer. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Die angelegte Verdünnungsreihe wurde mit Oligo d(A) und Core (p874as) als Reverse-Primer durchgeführt. Die für jede Verdünnungsstufe transkribierte cDNA wurde jeweils in eine Core_{GT}- sowie eine NS5B_{GT}-PCR überführt. Die Viruslasten sind in absteigender Reihenfolge dargestellt. Das Core_{GT}-Fragment lässt sich ab einer Konzentration von 10³ IU/mL und aufwärts, das NS5B_{GT}-Fragment ab einer Konzentration von 10² IU/mL und aufwärts amplifizieren (vgl. Effektivität Oligo d(A) in Abb. 21).

Im Folgenden wurde dieser bislang sensitivste Ansatz mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und p874As für alle weiteren Versuche verwendet. Es sollte als Nächstes untersucht werden, ob auch die für die Resistenztestung benötigten HCV-Genomabschnitte ausgehend von einem mit diesen Primern erzeugten RT-Produkt amplifiziert werden können.

3.8 Durchführbarkeit der Resistenzprotokolle ausgehend von einem RT-Ansatz (Oligo d(A) und p874as)

Mit dem bisher sensitivsten RT-Ansatz (Oligo d(A) und p874as) wurde im Folgenden die Durchführbarkeit der Resistenztestung untersucht. Da die PCR-Resistenzprotokolle genotypspezifisch sind, wurden die verschiedenen Genotypen separat voneinander getestet. Dabei wurden die Resistenzprotokolle der Genomabschnitte NS3, NS5A und NS5B jeweils ausgehend von einem RT-Ansatz je Patientenprobe, d. h. jeweils ausgehend von demselben cDNA-Produkt, untersucht (s. Abb. 24).

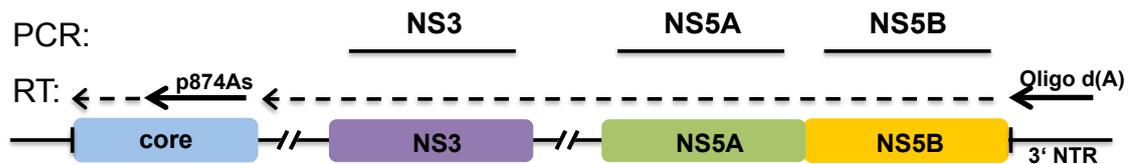


Abb. 24: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Core (p874As) und Oligo d(A)) am HCV-Genom sowie die Lage der drei für die Resistenztestung amplifizierten Fragmente. Das HCV-Genom ist unter Weglassen des Mittelteils vereinfacht vom 5'- zum 3'-Ende hin dargestellt (vgl. Abb. 1). Core (blau), NS3 (violett), NS5A (grün) und NS5B (gelb) markieren die entsprechende Anordnung der Genomabschnitte im HCV-Genom. Die dickgedruckten Pfeile stellen die Reverse-Primer der RT-Reaktion, sowie deren Ausrichtung und Ansatzstellen im Virusgenom dar. Die sich den Pfeilspitzen anschließenden gestrichelten Pfeile beschreiben die Länge und Richtung der in der RT-Reaktion transkribierten Fragmente. Die durchgehenden Linien stellen die mittels Resistenzprotokollen amplifizierten Fragmente (NS3, NS5A, NS5B) dar.

3.8.1 Genotyp 1a

Für sieben Patientenproben vom Genotyp 1a mit verschiedenen Viruslasten wurde jeweils eine RT-Reaktion mit den beiden RT-Primern Oligo d(A) und p874as durchgeführt. Das RT-Produkt (cDNA) aus jedem Ansatz wurde daraufhin jeweils in die drei Resistenztestungs-PCRs (NS3, NS5A, NS5B) überführt. Alle sieben Proben sind positiv für NS3, sechs von sieben für NS5A und fünf von sieben für NS5B (s. Abb. 25).

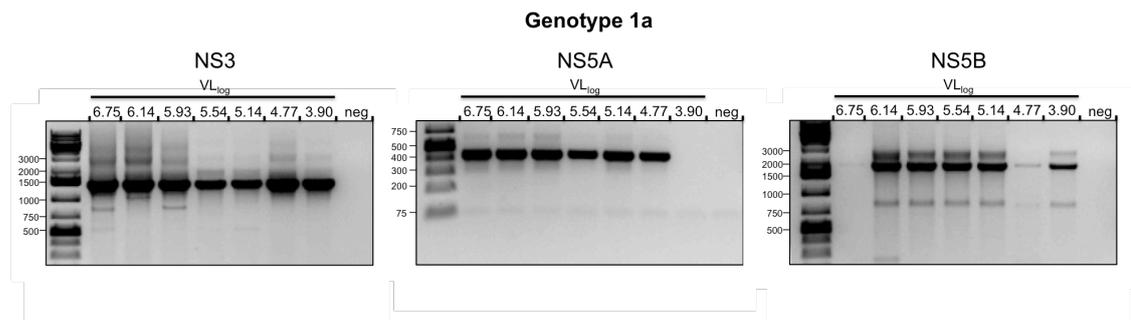


Abb. 25: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 1a wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für sieben Proben vom Genotyp 1a wurden RT-Reaktionen mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874as) angesetzt. Die entstandenen RT-Produkte (cDNA) wurden jeweils auf die drei für die Resistenztestung beim Genotyp 1a wichtigen PCRs übertragen. Die verschiedenen Viruslasten (VL) sind in absteigender Reihenfolge logarithmisch dargestellt. Der NS3-Abschnitt ließ sich für alle sieben Proben amplifizieren, NS5A für sechs von sieben und NS5B für fünf von sieben Proben.

3.8.2 Genotyp 1b

Für sieben Patientenproben vom Genotyp 1b mit verschiedenen Viruslasten wurde wie schon für Genotyp 1a jeweils eine RT-Reaktion mit den beiden RT-Primern Oligo d(A) und p874as durchgeführt. Das RT-Produkt (cDNA) aus jedem Ansatz wurde jeweils in die drei Resistenztestungs-PCRs (NS3, NS5A, NS5B) überführt. Alle sieben Proben sind positiv für alle drei (NS3, NS5A, NS5B) Resistenzprotokolle (s. Abb. 26).

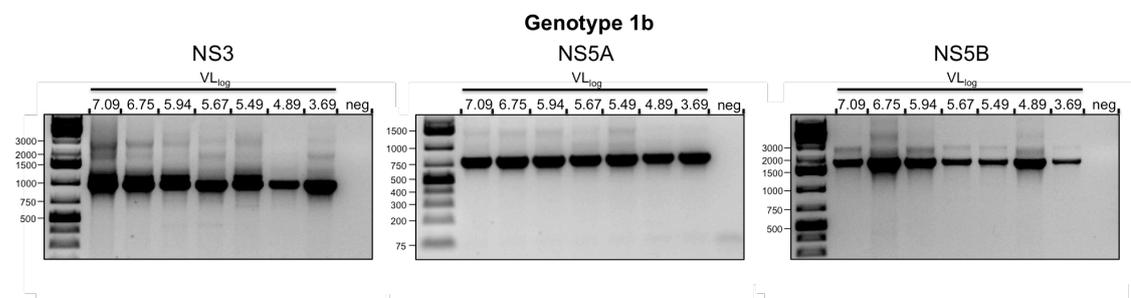


Abb. 26: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 1b wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für sieben Proben vom Genotyp 1b wurden RT-Reaktionen mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874as) angesetzt. Die entstandenen RT-Produkte (cDNA) wurden jeweils auf die drei für die Resistenztestung beim Genotyp 1b wichtigen PCRs übertragen. Die verschiedenen Viruslasten (VL) sind in absteigender Reihenfolge logarithmisch dargestellt. Alle drei Abschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ließen sich aus allen Proben amplifizieren.

3.8.3 Genotyp 3

Zum Zeitpunkt der Untersuchung spielten Protease-Inhibitoren bei der Therapie des Genotyps 3 keine Rolle. Da der für die Virus-Protease kodierende Genomabschnitt im NS3-Abschnitt liegt, wurde für diesen Bereich keine Resistenztestung durchgeführt.

Für sieben Patientenproben vom Genotyp 3 mit verschiedenen Viruslasten wurde wie bereits für die Genotypen 1a und 1b jeweils eine RT-Reaktion mit den beiden RT-Primern Oligo d(A) und p874as durchgeführt. Das RT-Produkt (cDNA) aus jedem Ansatz wurde dann in die beiden Resistenztestungs-PCRs (NS5A, NS5B) überführt.

Die Banden aller sieben Patientenproben sind sowohl für das Resistenzprotokoll der NS5A-Region als auch für das Resistenzprotokoll der NS5B-Region positiv (s. Abb. 27).

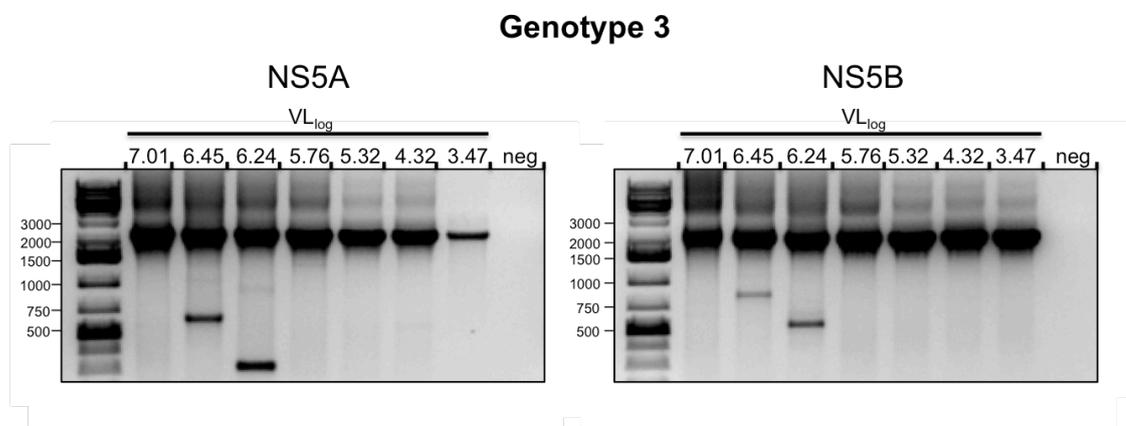


Abb. 27: **Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 3 wichtigen Genomabschnitte (NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für sieben Proben vom Genotyp 3 wurden RT-Reaktionen mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874as) angesetzt. Die entstandenen RT-Produkte (cDNA) wurden jeweils auf die beiden für die Resistenztestung beim Genotyp 3 wichtigen PCRs übertragen. Die verschiedenen Viruslasten (VL) sind in absteigender Reihenfolge logarithmisch dargestellt. Beide Abschnitte (NS5A, NS5B) ließen sich aus allen Proben amplifizieren.

3.8.4 Genotyp 2 und 4

Zum Zeitpunkt der Untersuchung gab es für den Genotyp 2 ebenfalls keine Medikamente, die am NS3-Abschnitt ansetzen (vgl. 3.8.3. Genotyp 3). Für drei Patientenproben vom Genotyp 2 mit verschiedenen Viruslasten wurde jeweils eine RT-Reaktion mit den beiden RT-Primern Oligo d(A) und p874as durchgeführt. Das RT-Produkt (cDNA) aus jedem Ansatz wurde in die beiden Resistenztestungs-PCRs (NS5A, NS5B) überführt.

Bei der Durchführung des NS5A-Resistenzprotokolls sind zwei von drei Proben positiv, beim NS5B-Resistenzprotokoll sind alle drei Proben positiv (s. Abb. 28).

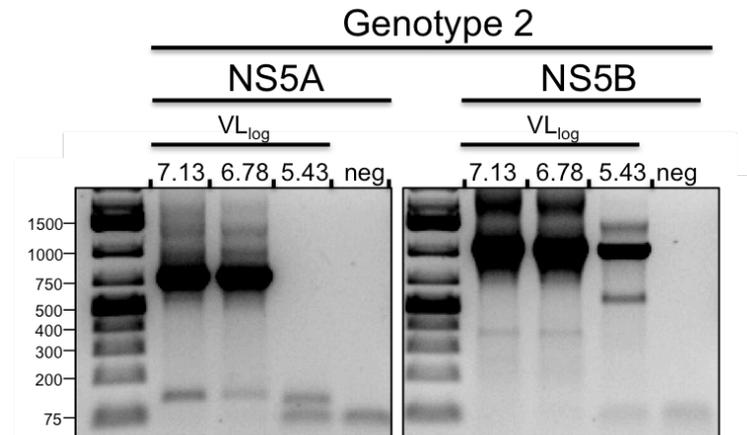


Abb. 28: **Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 2 wichtigen Genomabschnitte (NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen.** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für drei Proben vom Genotyp 2 wurden RT-Reaktionen mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874as) angesetzt. Die entstandenen RT-Produkte (cDNA) wurden jeweils auf die beiden für die Resistenztestung beim Genotyp 2 wichtigen PCRs übertragen. Die verschiedenen Viruslasten (VL) sind in absteigender Reihenfolge logarithmisch dargestellt. NS5A ließ sich für zwei von drei Proben amplifizieren. Für NS5B sind alle drei Banden positiv.

Für drei Patientenproben vom Genotyp 4 mit verschiedenen Viruslasten wurde jeweils eine RT-Reaktion mit den beiden RT-Primern Oligo d(A) und p874as durchgeführt. Das RT-Produkt (cDNA) aus jedem Ansatz wurde in die drei für den Genotyp 4 relevanten Resistenztestungs-PCRs (NS3, NS5A, NS5B) überführt.

Bei der Testung von Genotyp 4 waren alle drei Proben bei allen Resistenzprotokollen (NS3, NS5A, NS5B) positiv (s. Abb. 29).

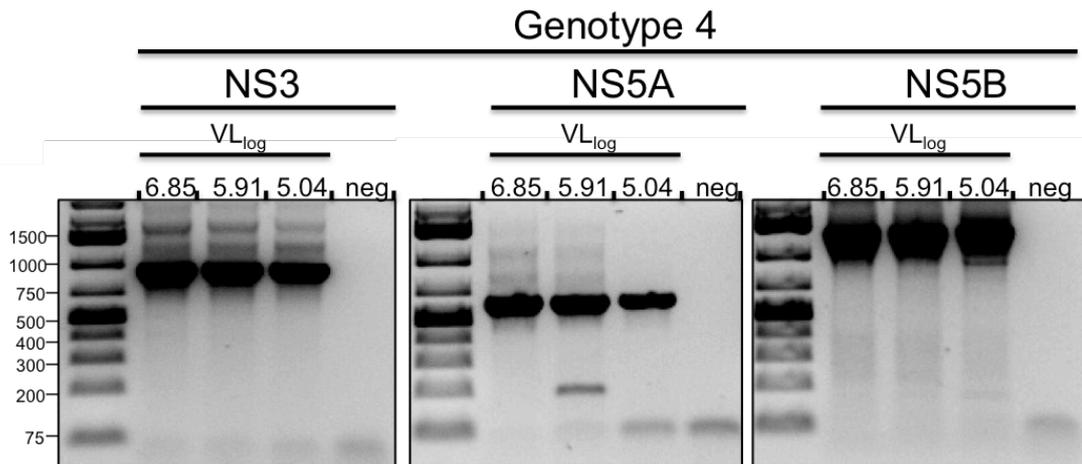


Abb. 29: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 4 wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 beschrieben. Für drei Proben vom Genotyp 4 wurden RT-Reaktionen mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874as) angesetzt. Die entstandenen RT-Produkte (cDNA) wurden jeweils auf die drei für die Resistenztestung beim Genotyp 4 wichtigen PCRs übertragen. Die verschiedenen Viruslasten (VL) sind in absteigender Reihenfolge logarithmisch dargestellt. Alle drei Abschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ließen sich aus allen Proben amplifizieren.

3.8.5 Überführung in die Routinediagnostik

Nach der Überprüfung der Effizienz des neu aufgestellten Protokolls mit positiven Ergebnissen wurde dieses in der Routinediagnostik der Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eingeführt. Zwischen August 2016 und März 2017 konnten mit dieser Methode 124 von 125 (99,2%) HCV-positive Patientenproben erfolgreich genotypisiert werden (Median VL 937.970 IU/ml; Spannweite 23-15.789.652 IU/ml). Die einzige Probe, welche sich nicht mit Hilfe der Core_{GT}-PCR genotypisieren ließ, hatte eine Viruslast von 23 IU/mL. Bemerkenswerterweise waren außerdem fünf von sechs Patientenproben mit Viruslasten unter 10.000 IU/mL positiv in der Core_{GT}-PCR, unter anderem eine Probe mit einer Viruslast von 938 IU/mL.

Von allen auf diese Weise genotypisierten Proben konnten 26 von 27 (96,2%) in der NS3-, 86 von 89 (96,6%) in der NS5A- und 17 von 18 (94,4%) in der NS5B-Resistenzanalyse erfolgreich untersucht werden. Nicht für jede Probe wurde eine vollständige Resistenztestung aller drei Regionen angefordert, woraus die unterschiedliche Anzahl an getesteten Proben je Amplifikationsprotokoll resultiert.

4 Neuer Diagnostischer Ablauf

Der entscheidende Unterschied zwischen dem neuen und dem bisherigen diagnostischen Ablauf (vgl. 1.6.3) ist die Reduzierung der RT-Reaktionen pro Patient bzw. pro Patientenprobe von mindestens zwei (Genotypisierung und eine Resistenztestung), oder teilweise bis zu vier (Genotypisierung und bis zu drei Resistenztestungen für NS3, NS5A und NS5B) auf nur eine einzige. Die aufgereinigte HCV-RNA eines HCV-positiven Patienten wird beim neuen RT-Ansatz mit den Reverse-Primern Oligo d(A) und Core (p874As) in einer einzigen RT-Reaktion in cDNA transkribiert, welche über alle für die Diagnostik relevanten Abschnitte hinwegläuft (s. Abb. 30, rot). Ausgehend von dem gewonnenen RT-Produkt können anschließend alle weiteren Testungen erfolgen. Die cDNA wird dabei in die jeweils benötigte PCR überführt. Anders als bisher, sind hiernach keine erneuten RT-Ansätze erforderlich.

In der diagnostischen Abfolge wird zunächst wie bisher der Genotyp der zu untersuchenden Probe bestimmt. Das RT-Produkt wird hierfür in die Core_{GT}-PCR überführt. Anschließend wird der Core-Abschnitt sequenziert und analysiert (s. Abb. 30, blau). Mit dem Wissen über den Genotyp kann nun, wie bereits beschrieben (vgl. 1.6.3), über das Therapiekonzept bzw. die dabei verwendeten Medikamente entschieden werden. Im nächsten Schritt kann die bereits gewonnene cDNA erneut herangezogen werden, um eine Testung auf die für den jeweiligen Genotyp relevanten Resistenzen durchzuführen (s. Abb. 30, violett, grün, orange). Dasselbe cDNA-Produkt, welches auch für die Genotypisierung verwendet wurde, dient also erneut als Ausgangssubstrat für alle weiteren PCRs. Je nach PCR-Protokoll werden jedoch unterschiedliche Abschnitte (NS3, NS5A oder NS5B) des HCV-Genoms amplifiziert. Die amplifizierten Bereiche werden anschließend sequenziert. Durch den Abgleich der Sequenz eines Abschnitts mit der Geno2Pheno Datenbank können bekannte zu Resistenzen führende Mutationen schon vor Verabreichung eines in Frage kommenden Medikamentes erkannt werden [75].

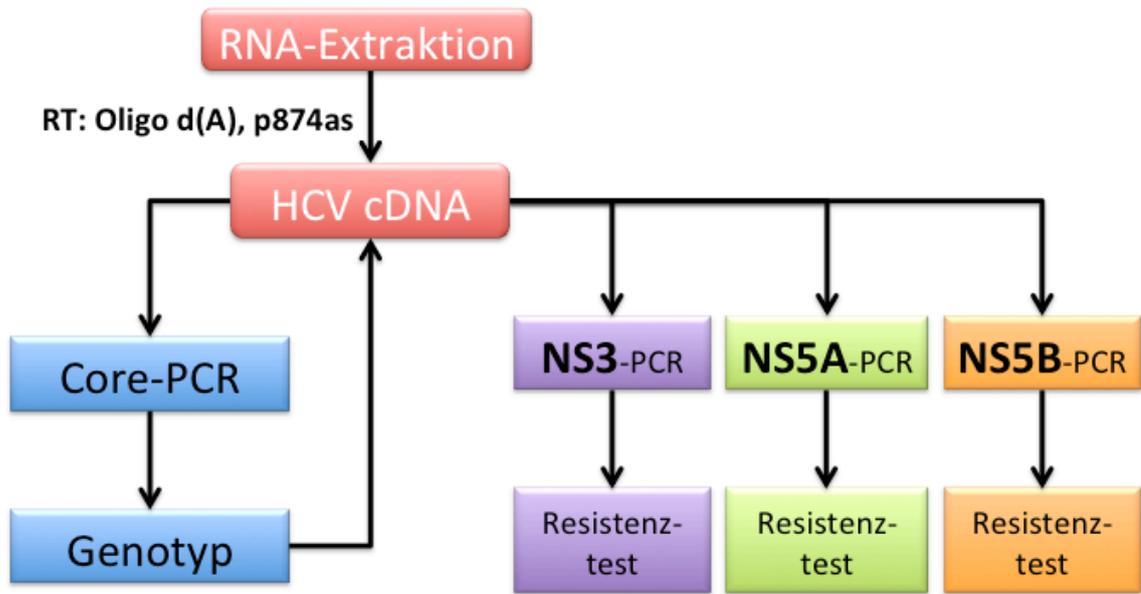


Abb. 30: **Flow-Chart des neuen Ablauf bei der Diagnostik einer HCV-Probe.** Die aufgereinigte HCV-RNA einer HCV-positiv getesteten Patientenprobe wird zunächst mittels einer einzigen RT-Reaktion mit den RT-Primern Oligo d(A) und p874as über alle für die spätere Diagnostik relevanten Bereiche hinweg in cDNA umgeschrieben (rot). Das gewonnene RT-Produkt wird in eine Core-PCR überführt und die amplifizierte DNA mittels Sequenzanalyse einem HCV-Genotyp zugeordnet (blau). Es wird nun erneut auf die HCV-cDNA zurückgegriffen. Je nachdem welcher Abschnitt auf resistenzerzeugende Mutationen getestet werden soll, wird die HCV-cDNA in die entsprechenden Resistenzprotokolle überführt, um anschließend die amplifizierten Bereiche zu sequenzieren und zu analysieren (violett, grün, orange).

5 Diskussion und Schlussfolgerungen

Mit der Zulassung der *direct-acting antivirals* (DAA) wurde auch die Testung auf mögliche Resistenzen schon vor Therapiebeginn relevant [76, 77]. Das HC-Virusgenom wird dabei mit Hilfe bestehender Datenbanken auf sogenannte RAVs (*resistance associated variants*) hin analysiert. Trotz der genotypübergreifenden Wirksamkeit der DAA bleibt die der Therapie vorausgehende Genotypisierung sowie Subtypen-Zuordnung nach wie vor von außerordentlicher klinischer sowie epidemiologischer Relevanz [61]. Nur auf diese Weise kann es gelingen die Therapie von Anfang an auf die natürlichen Resistenzen einzelner Genotypen anzupassen [67, 78].

Bislang wurden Genotypisierung und Resistenztestung in separaten, aufeinanderfolgenden Reaktionen durchgeführt, da die meisten Amplifikationsprotokolle genotypspezifische Primer verwenden und somit eine mehrstufige Diagnostik notwendig machen. In meiner Arbeit habe ich eine alternative Vorgehensweise im Ablauf der Genotypisierung und Resistenztestung HCV-positiver Patientenproben getestet. Die dadurch gegenüber den herkömmlichen Protokollen entstehenden wirtschaftlichen und qualitativen Vorteile sind wie folgt: Zum einen verringert sich der Arbeitsaufwand deutlich und damit auch die tatsächliche Arbeitszeit im Labor, welche zur vollständigen Testung einer Patientenprobe aufgewandt werden muss. Hinzu kommt eine Senkung der Kosten um schätzungsweise 50%, da die Anzahl der RT-Reaktionen, welche den kostenaufwändigsten Schritt bei der HCV-Diagnostik darstellen, auf eine einzige für jede Patientenprobe reduziert werden kann. Zum anderen erhöht die genotypunabhängige cDNA-Synthese die Erfolgsrate bei der Sequenzierung einzelner HCV-Genomabschnitte, da ein Versagen der *Nested-PCR* durch fehlerhaft ansetzende spezifische Reverse-Transkriptase-Primer bei der cDNA-Synthese auch bei hohen Viruslasten vermieden werden kann [79].

Bislang veröffentlichte Protokolle zur Transkription des gesamten HCV-Genoms verwenden spezielle RNA-Extraktionsverfahren und weitere von der Routinediagnostik abweichende Methoden bei der Probenaufbereitung oder beim Ablauf [80, 81]. Dahingegen ist es mir in meiner Arbeit gelungen nachweislich fast die gesamte HCV-RNA in cDNA umzuschreiben und dies unter den allgemeinen Standardbedingungen der klinischen Routinelabor Diagnostik. Dabei konnten nach einer einzigen RT-Reaktion erfolgreich Fragmente aus allen relevanten Bereichen des HCV-Genoms amplifiziert werden. Des Weiteren lässt der Reaktionsaufbau mit nur einem RT-Primer die Vermutung zu, dass bei der RT-Reaktion zusammenhängende cDNA-Moleküle transkribiert wurden, die das gesamte kodierende HCV-Genom abdecken. Dafür spricht auch, dass keine

spontane RNA-Transkription ohne Zusatz eines passenden RT-Primers beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine spontane cDNA-Synthese ohne RT-Primer, wie sie bereits von anderen Autoren beschrieben wurde [81], könnte ansonsten ebenfalls eine Erklärung für positive Amplifikationsergebnisse einzelner Genomabschnitte über das gesamte HC-Virusgenom hinweg darstellen.

Für die Genotypisierung mittels Sequenzierung und Sequenzanalyse werden meist die Genomabschnitte Core und NS5B herangezogen. Daher ist es plausibel, dass innerhalb dieser Genomabschnitte genotypspezifische Sequenzbereiche vorliegen müssen, die eine eindeutige Zuordnung zu einem Geno- bzw. Subtyp zulassen. Gleichzeitig müssen sie jedoch genotypübergreifend ausreichend konserviert sein, um das Ansetzen einheitlicher Primer zu ermöglichen [82]. Um einen neuen Genotyp erstmals zu beschreiben und um weitere Subtypen zu charakterisieren, müssen Genomabschnitte über die gesamte Virus-RNA hinweg sequenziert werden. Es gibt bislang verschiedene Ansätze für das Vorgehen bei der Charakterisierung eines neuen HCV-Genotypen: Es ist z.B. möglich, mit *random hexamer*-Primern (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) cDNA zu synthetisieren, welche im nächsten Schritt genutzt werden kann, um DNA-Fragmente mit konventioneller PCR zu amplifizieren [83-85]. Auf Grund der relativ willkürlichen Ansatzstellen der *random hexamers*, kann jedoch nicht nachvollzogen werden, wie lang die hierbei entstehenden cDNA-Fragmente tatsächlich sind. *Random hexamer*-Primer führen im Vergleich zu spezifischen Primern vorrangig zur Amplifikation kurzer cDNA-Stränge und weisen eine geringere Effizienz auf [86]. Eine sehr niedrige Viruslast der zu untersuchenden Probe sowie die Auswahl der für die RT-Reaktion herangezogenen Primer selbst sind demnach die limitierenden Faktoren, da eventuell nicht für jede sich anschließende PCR-Primer-Kombination ein ausreichend langer cDNA-Abschnitt synthetisiert werden kann. Weiterhin können für die Charakterisierung eines Genotyps gezielt einzelne, überlappende Genomabschnitte mittels RT-PCR und anschließender PCR-Amplifikation synthetisiert werden. Zu Beginn jedes PCR-Ansatzes steht dabei allerdings bislang eine Primer-spezifische RT-Reaktion mit HCV-RNA als Ausgangssubstrat [87].

Der von mir entwickelte Ablauf bei der Genotypisierung von HCV-Proben erlaubt neben weiterführenden diagnostischen Testungen auf mögliche Therapieresistenzen auch die Analyse der Sequenz des gesamten Virusgenoms ohne weitere RT-Reaktionen. Nach der Transkription des gesamten RNA-Virusgenoms in cDNA, als erstem Schritt des diagnostischen Ablaufs, kann die erzeugte cDNA als Ausgangssubstrat für die Amplifikation und Sequenzierung jeglicher Bereiche von Interesse im Virusgenom dienen.

Beim Vergleich verschiedener Primer, konnte ich selbst keine Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Gewinnung des gesamten HCV-Genoms feststellen, unabhängig davon, welche Primer verwendet wurden. Sowohl mit dem spezifischen RT-Primer SV542as als auch mit dem unspezifischen RT-Primer Oligo d(A) war die Amplifikation des NS5B_{GT}-Fragments jeweils effizienter als die des Core_{GT}-Fragments, sodass davon auszugehen ist, dass auch kurze cDNA-Fragmente transkribiert wurden. Der RT-Primer Oligo d(A) war im Vergleich zu SV542as jedoch sensitiver bei der Amplifikation des NS5B_{GT}-Fragments und ermöglichte eine Genotypisierung auch bei niedrigeren Viruslasten. Außerdem waren mit Oligo d(A) deutlich weniger Nebenbanden zu verzeichnen als mit SV542as. Der ebenfalls zunächst verwendete Primer x-tail bindet in der konservierten aber hochgradig strukturierten x-tail-Region des HCV-RNA-Moleküls, wodurch die korrekte Initiation der cDNA-Synthese möglicherweise gestört wird. Zu sehen ist, dass auch der x-tail-Primer bei der Amplifikation der NS5B_{GT}-Region weniger sensitiv ist als der Oligo d(A)-Primer, wobei jedoch beide Primer die gleiche Sensitivität für die Core_{GT}-Region aufweisen. Warum demzufolge durch den x-tail-Primer vorrangig die Herstellung kurzer cDNA-Abschnitte beeinflusst wird, nicht aber die Transkription des gesamten HCV-Genoms, bleibt unklar.

Das NS5B_{GT}-Fragment konnte mit Oligo d(A) als RT-Primer ausgehend von Viruslasten von 100 IU/mL amplifiziert werden. Oligo d(A) bindet an den Poly-Uracil-Trakt der HCV-RNA, wobei vermutlich vor allem das Fehlen von Sekundärstrukturen an dieser Stelle des Virusgenoms ein sicheres Binden des Primers an das RNA-Molekül und damit eine effiziente Initiation der cDNA-Synthese erlaubt. Außerdem senkt Oligo d(A) interessanter Weise signifikant die Anzahl unspezifischer Amplifikationen, welche vor allem bei SV542as in Form unspezifischer Banden in der Gelelektrophorese zu sehen sind. Sie stellen damit die Hauptproblematik der NS5B_{GT}-Primerkombinationen dar. Um auch die Genotypisierung von HCV-Proben niedriger Viruslast zu gewährleisten, wurde Oligo d(A) mit dem Core-spezifischen Primer (p874as) kombiniert. Auf diese Weise gelang es, auch die Sensitivität bei der Amplifikation der Core-Region noch weiter zu erhöhen. Core_{GT} konnte daraufhin mit Oligo d(A) und p874as als RT-Primer ausgehend von Viruslasten von 1000 IU/mL amplifiziert werden. Zwar ist die HCV-Genotypisierung grundsätzlich ebenso mit der NS5B-Region möglich, in der Routinediagnostik stellt die Genotypisierung mittels Core_{GT} jedoch häufig das etablierte Vorgehen dar, da sie spezifischer und sensitiver ist [70]. Außerdem konnte ich zeigen, dass sich die beiden Reverse-Primer, die an unterschiedlichen Stellen im Virusgenom ansetzen, nicht in entscheidendem Maße behindern. Dies konnte zuvor bereits für SV542as und Core (p874as) gezeigt werden. Von daher ergeben sich durch den zusätzlichen Primer Core (p874as) keine Nachteile

gegenüber einem Ein-Primer-Protokoll mit Oligo d(A). Weitere ausgewählte Proben der Genotypen 1 - 4 zeigten, dass die Kombination aus den beiden RT-Primern Oligo d(A) und dem Core-Primer (p874as) darüber hinaus nicht mit der Amplifikation der für Resistenztestung wichtigen Abschnitte NS3, NS5A und NS5B interferiert. Es bleibt jedoch zu beachten, dass es bei der Verwendung mehrerer RT-Primer in einer Reaktion eventuell zu Strangabbrüchen vor den Primer-Insertionsstellen kommt. Zu untersuchende HCV-Genomabschnitte, welche diese Insertionsstelle beinhalten, sind dann möglicherweise nicht mittels anschließender PCR amplifizierbar. Um diese Problematik zu umgehen wurden die RT-Primer so gewählt, dass sie nicht innerhalb von Genomabschnitten ansetzen, die in der Routinediagnostik analysiert werden sollen. Auf diese Weise wird also verhindert, dass die verwendeten Primer selbst zu Strangabbrüchen innerhalb der relevanten Abschnitte führen könnten.

Von 125 in der Routinediagnostik analysierten Patientenproben konnten alle bis auf eine, welche eine Viruslast von 23 IU/mL aufwies, genotypisiert werden. Unter ihnen waren auch Proben mit Viruslasten <1000 IU/mL HCV-RNA. Die Amplifikation der für die Resistenztestung herangezogenen Genomabschnitte war in 96,2 % für NS3, in 96,6 % für NS5A und in 94,4 % für NS5B möglich. Theoretisch könnte die Anwendung von Pan-Genotyp-Primern auch bei *Nested*-PCR-Protokollen sowohl die Genotypisierung als auch die Resistenztestung weiter vereinfachen [88-90]. Nichtsdestotrotz bleibt die Genotypisierung mittels NS-Proteinen aufgrund eines Mangels an vollständigen Genomsequenzen seltener Genotypen schwierig und die bisher verzeichneten Amplifikationsraten sind niedriger (78-90%) im Vergleich zu genotypspezifischen Protokollen [89, 90].

Nach der Etablierung des neuen Diagnostikprotokolls in der Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden lediglich die für die jeweilige Patientenprobe angeforderten Regionen analysiert. Hierdurch kommt es zu vergleichsweise geringen Datenmengen für die in der Resistenztestung verwendeten Genomabschnitte NS3 sowie NS5B. Demzufolge sollte beachtet werden, dass sich die errechnete Amplifikationseffizienz mit einer höheren Anzahl getesteter Proben verändern könnte. Eine weitere Einschränkung der vorliegenden Daten ergibt sich daraus, dass das Protokoll ausschließlich an den Genotypen 1 - 4 getestet wurde. Dies rührt daher, dass keine Patientenproben der Genotypen 5 - 7 für Versuche zur Verfügung standen. Allerdings bleibt eine universelle Anwendbarkeit auch für andere bisher nicht getestete Genotypen anzunehmen, da die Bindungsstelle des Reverse-Primers Oligo d(A) in allen Genotypen konserviert ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es mir gelungen ist, ein RT-Protokoll zu entwickeln, welches die cDNA-Synthese des vollständigen HCV-Virusgenoms ermöglicht. Dieses RT-Protokoll hat darüber hinaus bereits Anwendung in der Routinediagnostik gefunden. Ausgehend von der gewonnenen cDNA kann sowohl die Genotypisierung mittels Core_{GT}- und NS5B_{GT}-PCR als auch die Resistenztestung der Genomabschnitte NS3, NS5A und NS5B durchgeführt werden. Außerdem ist auch die Sequenzierung weitaus größerer Genomabschnitte des HC-Virus bis hin zur Sequenzierung des vollständigen HCV-Genoms ausgehend von der im initialen Schritt erzeugten cDNA denkbar.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Walker, A., et al., *A genotype independent, full-genome reverse-transcription protocol for HCV genotyping and resistance testing*. J Clin Virol, 2017. **91**: p. 42-48.
2. Robert-Koch-Institut, *Hepatitis C im Jahr 2014*. Epidemiologisches Bulletin, 2015. **30**.
3. Taylor, L.E., et al., *The spectrum of undiagnosed hepatitis C virus infection in a US HIV clinic*. AIDS Patient Care STDS, 2014. **28**(1): p. 4-9.
4. World Health Organisation. *Hepatitis C – Fact Sheet N°164 Geneva: Who; 2014*. 2019, July 9; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
5. Westbrook, R.H. and G. Dusheiko, *Natural history of hepatitis C*. J Hepatol, 2014. **61**(1 Suppl): p. S58-68.
6. Petruzzello, A., *Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma*. Open Virol J, 2018. **12**: p. 26-32.
7. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. **345**(1): p. 41-52.
8. Falla, A.M., et al., *Estimating the scale of chronic hepatitis C virus infection in the EU/EEA: a focus on migrants from anti-HCV endemic countries*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 42.
9. Kamkamidze, G., M. Butsashvili, and K. Gendzekhadze, *Immunogenetic Factors Influencing Clinical Course of Hcv Infection (Review)*. Georgian Med News, 2016(258): p. 84-89.
10. Thimme, R., et al., *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-8.
11. Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell, *Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes*. Semin Liver Dis, 1995. **15**(1): p. 41-63.
12. Drummer, H.E., *Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 329.
13. Organization, W.H., *Global Hepatitis Report*. 2017.
14. Polaris Observatory, H.C.V.C., *Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017. **2**(3): p. 161-176.
15. Thein, H.H., et al., *Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 418-31.
16. Welsch, C., et al., *New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives*. Gut, 2012. **61 Suppl 1**: p. i36-46.
17. Seeff, L.B. and J.H. Hoofnagle, *National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S1-2.
18. Verna, E.C. and R.S. Brown, Jr., *Hepatitis C virus and liver transplantation*. Clin Liver Dis, 2006. **10**(4): p. 919-40.
19. Kim, W.R., et al., *Trends in waiting list registration for liver transplantation for viral hepatitis in the United States*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1680-6.
20. Jahan, S., et al., *Hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma*. Infect Agent Cancer, 2012. **7**(1): p. 2.
21. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5326-38.

22. Buhler, S. and R. Bartenschlager, [*Molecular mechanisms of hepatitis C virus (HCV) replication - implications for the development of antiviral drugs*]. *Z Gastroenterol*, 2011. **49**(7): p. 836-44.
23. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. *J Virol*, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
24. Lavie, M., A. Goffard, and J. Dubuisson, *Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer*. *Curr Issues Mol Biol*, 2007. **9**(2): p. 71-86.
25. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. *Science*, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
26. Lemay, K.L., et al., *A hepatitis C virus NS5A phosphorylation site that regulates RNA replication*. *J Virol*, 2013. **87**(2): p. 1255-60.
27. Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, and J. Treadaway, *Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(3): p. e1000032.
28. Simmonds, P., *Variability of hepatitis C virus*. *Hepatology*, 1995. **21**(2): p. 570-83.
29. Smith, D.B., et al., *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 318-27.
30. Cuypers, L., et al., *Genetic Diversity and Selective Pressure in Hepatitis C Virus Genotypes 1-6: Significance for Direct-Acting Antiviral Treatment and Drug Resistance*. *Viruses*, 2015. **7**(9): p. 5018-39.
31. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. *Hepatology*, 2005. **42**(4): p. 962-73.
32. Messina, J.P., et al., *Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes*. *Hepatology*, 2015. **61**(1): p. 77-87.
33. Kiser, J.J. and C. Flexner, *Direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus infection*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. **53**: p. 427-49.
34. Okanou, T., et al., [*Side effects of interferon on endocrine and respiratory system in 545 cases of chronic hepatitis C*]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 1994. **91**(5): p. 995-1002.
35. Andrade, L.J.D.O., et al., *Thyroid dysfunction in hepatitis C individuals treated with interferon-alpha and ribavirin - A review*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008. **12**(2): p. 144-148.
36. Zahi, C.D. and M. Rimbas, *Neuropsychiatric side-effects of interferon-alpha treatment: pathophysiology and therapeutic options*. *Maedica (Buchar)*, 2014. **9**(2): p. 121-6.
37. Everson, G.T., et al., *Efficacy of an interferon- and ribavirin-free regimen of daclatasvir, asunaprevir, and BMS-791325 in treatment-naive patients with HCV genotype 1 infection*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(2): p. 420-9.
38. Desmond, C.P., et al., *Sustained virological response rates and durability of the response to interferon-based therapies in hepatitis C patients treated in the clinical setting*. *J Viral Hepat*, 2006. **13**(5): p. 311-5.
39. Mishra, P., J. Murray, and D. Birnkrant, *Direct-acting antiviral drug approvals for treatment of chronic hepatitis C virus infection: Scientific and regulatory approaches to clinical trial designs*. *Hepatology*, 2015. **62**(4): p. 1298-303.
40. Lawitz, E., et al., *A phase 2a trial of 12-week interferon-free therapy with two direct-acting antivirals (ABT-450/r, ABT-072) and ribavirin in IL28B C/C patients with chronic hepatitis C genotype 1*. *J Hepatol*, 2013. **59**(1): p. 18-23.
41. Lawitz, E., et al., *Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial*. *Lancet*, 2014. **383**(9916): p. 515-23.

42. Medeiros, T., et al., *Adverse effects of direct acting antiviral-based regimens in chronic hepatitis C patients: a Brazilian experience*. *Int J Clin Pharm*, 2017. **39**(6): p. 1304-1311.
43. Sarrazin, C., et al., *[Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-C-virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection - AWMF-Register-No.: 021/012]*. *Z Gastroenterol*, 2018. **56**(7): p. 756-838.
44. Gane, E.J., et al., *Efficacy of Sofosbuvir, Velpatasvir, and GS-9857 in Patients With Hepatitis C Virus Genotype 2, 3, 4, or 6 Infections in an Open-Label, Phase 2 Trial*. *Gastroenterology*, 2016. **151**(5): p. 902-909.
45. Hepatitis C Online. *HCV Medications (FDA-Approved)*. 2020, January 11; Available from: <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs>.
46. Sagnelli, E., et al., *Resistance detection and re-treatment options in hepatitis C virus-related chronic liver diseases after DAA-treatment failure*. *Infection*, 2018.
47. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C treatment: the data flood goes on-an update from the liver meeting 2014*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(3): p. 468-79.
48. Carrasco, I., et al., *Baseline NS5A resistance associated substitutions may impair DAA response in real-world hepatitis C patients*. *J Med Virol*, 2018. **90**(3): p. 532-536.
49. Paolucci, S., et al., *Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients*. *Virol J*, 2013. **10**: p. 355.
50. Paolucci, S., et al., *Development and persistence of DAA resistance associated mutations in patients failing HCV treatment*. *J Clin Virol*, 2015. **72**: p. 114-8.
51. Welzel, T.M., et al., *Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses*. *J Hepatol*, 2017. **67**(2): p. 224-236.
52. Li, Z., et al., *Naturally occurring drug resistance associated variants to hepatitis C virus direct-acting antiviral agents in treatment-naive HCV genotype 1b-infected patients in China*. *Medicine (Baltimore)*, 2017. **96**(19): p. e6830.
53. Palanisamy, N., et al., *Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals*. *Antivir Ther*, 2018.
54. Di Maio, V.C., et al., *Frequent NS5A and multiclass resistance in almost all HCV genotypes at DAA failures: What are the chances for second-line regimens?* *J Hepatol*, 2018. **68**(3): p. 597-600.
55. Abbott Molecular Inc., *Abbott RealTime HCV Genotype II package insert*. Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL, USA, 2013.
56. Verbeeck, J., et al., *Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(6): p. 1901-6.
57. Liu, C.H., et al., *Comparison of Abbott RealTime HCV Genotype II with Versant line probe assay 2.0 for hepatitis C virus genotyping*. *J Clin Microbiol*, 2015. **53**(5): p. 1754-7.
58. Daniel, H.D., et al., *Comparison of Three Different Hepatitis C Virus Genotyping Methods: 5'NCR PCR-RFLP, Core Type-Specific PCR, and NS5b Sequencing in a Tertiary Care Hospital in South India*. *J Clin Lab Anal*, 2017. **31**(3).
59. Mallory, M.A., et al., *Evaluation of the Abbott RealTime HCV genotype II plus RUO (PLUS) assay with reference to core and NS5B sequencing*. *J Clin Virol*, 2017. **90**: p. 26-31.
60. Souii, A., et al., *Hepatitis C Genotype Prevalence in Monastir Region, Tunisia: Correlation between 5' Untranslated Region (5'UTR), Non-structural 5B (NS5B), and Core Sequences in HCV Subtyping*. *Curr Microbiol*, 2016. **73**(3): p. 324-34.
61. Ceccherini Silberstein, F., et al., *Hepatitis C virus gene sequencing as a tool for precise genotyping in the era of new direct antiviral agents*. *Hepatology*, 2016. **63**(3): p. 1058-9.

62. Sariguzel, F.M., et al., *Evaluation of the Abbott Real Time HCV genotype II assay for Hepatitis C virus genotyping*. Pak J Med Sci, 2015. **31**(5): p. 1136-9.
63. Benedet, M., et al., *The need for a sequencing-based assay to supplement the Abbott m2000 RealTime HCV Genotype II assay: a 1 year analysis*. J Clin Virol, 2014. **60**(3): p. 301-4.
64. He, C., et al., *Utility of the Abbott RealTime HCV Genotype Plus RUO assay used in combination with the Abbott RealTime HCV Genotype II assay*. J Clin Virol, 2018. **99-100**: p. 97-100.
65. Sridhar, S., et al., *Impact of inter-genotypic recombination and probe cross-reactivity on the performance of the Abbott RealTime HCV Genotype II assay for hepatitis C genotyping*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018. **91**(1): p. 34-37.
66. De Keukeleire, S., P. Descheemaeker, and M. Reynders, *Diagnosis of hepatitis C virus genotype 2k/1b needs NS5B sequencing*. Int J Infect Dis, 2015. **41**: p. 1-2.
67. Sarrazin, C., *The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice*. J Hepatol, 2016. **64**(2): p. 486-504.
68. Ruggiero, T., et al., *HCV NS3 naturally occurring variants in HIV/HCV coinfecting DAA-naive patients: consideration for HCV genotyping resistance testing*. Infection, 2016. **44**(6): p. 789-792.
69. Paolucci, S., et al., *Baseline and Breakthrough Resistance Mutations in HCV Patients Failing DAAs*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16017.
70. Cai, Q., et al., *Comparison of three different HCV genotyping methods: core, NS5B sequence analysis and line probe assay*. Int J Mol Med, 2013. **31**(2): p. 347-52.
71. Kuntzen, T., et al., *A set of reference sequences for the hepatitis C genotypes 4d, 4f, and 4k covering the full open reading frame*. J Med Virol, 2008. **80**(8): p. 1370-8.
72. Susser, S., et al., *Origin, prevalence and response to therapy of hepatitis C virus genotype 2k/1b chimeras*. J Hepatol, 2017. **67**(4): p. 680-686.
73. Zakalashvili, M., et al., *Identification of hepatitis C virus 2k/1b intergenotypic recombinants in Georgia*. Liver Int, 2018. **38**(3): p. 451-457.
74. Schuermans, W., et al., *Heads or Tails: Genotyping of Hepatitis C Virus Concerning the 2k/1b Circulating Recombinant Form*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
75. Kalaghatgi, P., et al., *Geno2pheno[HCV] - A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155869.
76. US Food and Drug Administration, *Prescribing Information Daklinza*. 2016.
77. US Food and Drug Administration, *Prescribing Information Zepatier*. 2016.
78. Komatsu, T.E., et al., *Regulatory Analysis of Effects of Hepatitis C Virus NS5A Polymorphisms on Efficacy of Elbasvir and Grazoprevir*. Gastroenterology, 2017. **152**(3): p. 586-597.
79. Walker, A., et al., *Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing*. J Virol, 2016. **90**(1): p. 33-42.
80. Zhang, E.Z., et al., *Development of a sensitive RT-PCR method for amplifying and sequencing near full-length HCV genotype 1 RNA from patient samples*. Virol J, 2013. **10**: p. 53.
81. Fan, X., Y. Xu, and A.M. Di Bisceglie, *Efficient amplification and cloning of near full-length hepatitis C virus genome from clinical samples*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(4): p. 1163-72.
82. Sandres-Saune, K., et al., *Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region*. J Virol Methods, 2003. **109**(2): p. 187-93.
83. Li, C., et al., *Complete genomic sequences for hepatitis C virus subtypes 4b, 4c, 4d, 4g, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r and 4t*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 8): p. 1820-6.
84. Lu, L., et al., *The full-length genome sequences of nine HCV genotype 4 variants representing a new subtype 4s and eight unclassified lineages*. Virology, 2015. **482**: p. 111-6.

85. Li, C., et al., *An expanded taxonomy of hepatitis C virus genotype 6: Characterization of 22 new full-length viral genomes*. *Virology*, 2015. **476**: p. 355-363.
86. Stangegaard, M., I.H. Dufva, and M. Dufva, *Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA*. *Biotechniques*, 2006. **40**(5): p. 649-57.
87. Timm, J., et al., *Characterization of full-length hepatitis C virus genotype 4 sequences*. *J Viral Hepat*, 2007. **14**(5): p. 330-7.
88. Besse, B., et al., *Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method*. *J Virol Methods*, 2012. **185**(1): p. 94-100.
89. Lindstrom, I., et al., *Prevalence of polymorphisms with significant resistance to NS5A inhibitors in treatment-naive patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3a in Sweden*. *Infect Dis (Lond)*, 2015. **47**(8): p. 555-62.
90. Nishiya, A.S., et al., *HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in Sao Paulo, Brazil*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86413.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Schematische Darstellung des HCV-Genoms.....</i>	<i>3</i>
<i>Abb. 2: Positionen von wichtigen Resistenzen im HCV-Genom.....</i>	<i>7</i>
<i>Abb. 3: Schematische Darstellung des HCV-Genoms mit den bei der Genotypisierung verwendeten Abschnitten</i>	<i>8</i>
<i>Abb. 4: Bedeutende Genomabschnitte für die Resistenztestung des HC-Virus.....</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 5: Flow-Chart des bisherigen Ablaufs bei der Diagnostik einer HCV-Probe.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 6: Ansatzstellen der RT-Primer (p874A und SV542as) an der HCV-RNA und Lage der amplifizierten DNA-Abschnitte.....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 7: Nachweis der Amplifikation zweier unabhängiger HCV-Genomabschnitte ausgehend von einer gemeinsamen RT-Reaktion mit zwei verschiedenen Reverse-Primern</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 8: Amplifizierte Bereiche aus verschiedenen Regionen des HCV-Genoms mit SV542as als alleinigem Reverse-Primer in der RT-Reaktion</i>	<i>25</i>
<i>Abb. 9: Ansatz des Reverse-Primers SV542as am HCV-Genom sowie Lokalisation der mit Core_{GT}- und NS5B_{GT}-PCR amplifizierten Abschnitte</i>	<i>26</i>
<i>Abb. 10: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} aus HCV-Proben mit verschiedenen Viruslasten nach RT-Reaktion mit SV542as</i>	<i>27</i>
<i>Abb. 11: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} aus einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der niedrigsten für die Genotypisierung verwendbaren Viruslast.....</i>	<i>28</i>
<i>Abb. 12: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} bei verschiedenen Genotypen nach Transkription mit einem alleinigen Reverse-Primer (SV542as) in der RT-Reaktion</i>	<i>29</i>
<i>Abb. 13: Ansatzstellen der Reverse-Primer (p874As, SV542as und 9560-R (x-tail)) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente ..</i>	<i>31</i>
<i>Abb. 14: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As)</i>	<i>31</i>

Abb. 15: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} ausgehend von einer gemeinsamen RT-Reaktion von zwei mit den bisher üblichen Verfahren nicht zu genotypisierenden Proben.....	33
Abb. 16: Amplifikation von Core_{GT} und NS5B_{GT} ausgehend von jeweils einer gemeinsamen RT-Reaktion bei drei Proben mit HCV-Chimären vom Typ 2k/1b	34
Abb. 17: Ansatzstellen der Reverse-Primer (p874As, SV542as und 9560-R (x-tail)) am HCV-Genom sowie die Lage zweier resistenzrelevanter Regionen	35
Abb. 18: Amplifikation des für die NS5A-Resistenzbestimmung relevanten Abschnitts (NS5A_{RR}) bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As).....	36
Abb. 19: Amplifikation des für die NS5B-Resistenzbestimmung relevanten Abschnitts (NS5B_{RR}) bei verschiedenen Genotypen nach RT-Reaktion mit drei Reverse-Primern (x-tail, SV542as, p874As).....	37
Abb. 20: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Oligo d(A), x-tail und SV542as) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente ..	38
Abb. 21: Verdünnungsreihen zum Vergleich der Effektivität verschiedener Reverse-Primer	39
Abb. 22: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Core (p874As) und Oligo d(A)) am HCV-Genom sowie die Lage der für die Genotypisierung amplifizierten Fragmente ..	40
Abb. 23: Verdünnungsreihe zur Testung der Effektivität eines kombinierten RT-Ansatzes mit Oligo d(A) und Core (p874as) als Reverse-Primer.....	40
Abb. 24: Ansatzstellen der Reverse-Primer (Core (p874As) und Oligo d(A)) am HCV-Genom sowie die Lage der drei für die Resistenztestung amplifizierten Fragmente	41
Abb. 25: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 1a wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen	42

Abb. 26: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 1b wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen	42
Abb. 27: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 3 wichtigen Genomabschnitte (NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen	43
Abb. 28: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 2 wichtigen Genomabschnitte (NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen	44
Abb. 29: Amplifikation der für die Resistenztestung beim Genotyp 4 wichtigen Genomabschnitte (NS3, NS5A, NS5B) ausgehend von einem RT-Ansatz mit zwei Reverse-Primern (Oligo d(A) und Core (p874as)) bei verschiedenen RNA-Konzentrationen	45
Abb. 30: Flow-Chart des neuen Ablauf bei der Diagnostik einer HCV-Probe	47

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über die Namen häufiger, allgemein anerkannter Geno- und Subtypen</i>	<i>4</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über zur HCV-Therapie zugelassene Direct-Acting Antivirals (DAA).....</i>	<i>5</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht über zur HCV-Therapie zugelassene Kombinations-Präparate.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 4: Protokoll der Reversen Transkription sowie PCR-Protokolle für die HCV-Genotypisierung.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 5: PCR-Protokolle für die HCV-Resistenztestungen je nach Genomabschnitt und Genotyp (GT).....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht über die Primer-Kombinationen der verwendeten Nested-PCRs</i>	<i>19</i>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2015 bis März 2017 am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf angefertigt. Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte sie in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater **Prof. Dr. Jörg Timm**, der es mir ermöglicht hat, im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf meine experimentelle Forschung durchzuführen und meine Dissertation zu verfassen. Er hat mich über meine wissenschaftliche Arbeit hinaus stets mit viel Verständnis und Geduld unterstützt und meinen beruflichen Werdegang in der Medizin nachhaltig gefördert.

Für konstruktive Anregungen danke ich ebenso **Prof. Dr. Birgit Henrich**, die sich bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit als zweite Gutachterin zu betreuen.

Für die vielfältige Unterstützung und die kontinuierliche Begleitung während der Zeit der Anfertigung meiner Dissertation bin ich besonders **Dr. Andreas Walker** vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf verbunden. Ich bin ihm zutiefst dankbar für die engagierte Projektbetreuung, inhaltliche Begutachtung und Ausrichtung, und die thematische Eingrenzung meiner Arbeit. Durch sein großes Engagement, fachliche Hinweise und sein professionelles Lektorat hat Dr. Andreas Walker wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch **Dr. Nadine Lübke**, die mir mit Rat zur Seite stand und ihr fachliches Wissen bereitwillig mit mir geteilt hat.

Im Rahmen meiner experimentellen Forschung gilt mein spezieller Dank **Jennifer Camdereli**, die mich bei der Durchführung zahlreicher Versuche entscheidend unterstützt hat.

Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei **Dr. Tina Senff**, **Janine Brinkmann** und **Dr. Christine Thöns** bedanken, die mich jederzeit freundlich mit Hilfestellungen unterstützt und die Zeit meiner experimentellen Arbeit mit guten Gesprächen bereichert haben.

Bei der gesamten „AG Timm“ des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf möchte ich mich für die großartige und unterstützende Atmosphäre im Team sowie die motivierenden und unterhaltsamen Pausen bedanken.

Danke auch an **Christiane Cramer** für die freundlichen Gespräche und die gelungene administrative Arbeit an jedem einzelnen Tag.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben vielen Freunden meinem Ehemann, **Ryan D. Barrette**, der mir in frohen wie in schwierigen Zeiten immer zur Seite steht und mein Leben täglich bereichert, sowie meinen Eltern, **Dorothee Bartsch** und **Klemens Bergmann**, die mich stets in all meinen Bestrebungen unterstützt und ermuntert haben.