

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

**Etablierung einer Genotyp unabhängigen Amplifikation der
Hepatitis C Virus NS5A Region zur simultanen Genotypisierung
und Resistenztestung**

Dissertation

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

vorgelegt von
Kim Sophie Carolin Ennker
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jörg Timm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

„Geld ist rund und rollt weg, aber Bildung bleibt.“

Heinrich Heine

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikation

Walker, A., Ennker, K.S., Lübke, N., Kaiser, R., Timm, J., (2019), A pan-genotyping Hepatitis C Virus NS5A amplification method for reliable genotyping and resistance testing. *J Clin Virol*, (113) S.8-13) [1]

Zusammenfassung

Eine chronische Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) ist eine Erkrankung, die unbehandelt zu schwerwiegenden Lebererkrankungen und zum Tod führen kann. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit ca. 58 Millionen Menschen chronisch infiziert.

Die Zulassung von *direct-acting antivirals* (DAA) revolutionierte die bisherige HCV-Therapie und ermöglichte, bei verkürzter Therapiedauer und reduziertem Nebenwirkungsprofil, Virusheilungsraten von >95%. Trotz der hohen Effektivität der antiviralen Therapie gegen alle HCV-Genotypen, ist die Bestimmung des Genotyps für die Therapieplanung weiterhin von Bedeutung. Darüber hinaus spielen Resistenz-assoziierte Substitutionen (RAS) im Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) des HCV-Replikationskomplexes eine Rolle, indem sie die Effektivität einer Therapie einschränken können. Obwohl in allen derzeit zugelassenen DAA-Kombinationstherapien NS5A-Inhibitoren integriert sind, werden Resistenztestungen nicht routinemäßig durchgeführt. Zur optimalen Therapiefindung einer genotypisch angepassten Medikamentenkombination wäre eine kombinierte Bestimmung des HCV-Genotyps mit einer Resistenzanalyse der NS5A-Region von Interesse, was jedoch bisher nicht im Rahmen der aktuellen Standarddiagnostik erfolgt.

Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Etablierung einer pan-genotypischen HCV-NS5A Amplifikationsmethode mit dem Fokus auf einer zuverlässigen Genotypisierung und simultanen Resistenztestung für eine schnellere und wirtschaftlichere Routinediagnostik. Hierzu wurden pan-genotypisch degenerierte PCR-Primer für die Genotypen 1-7 entworfen und bei 262 HCV-Patienten getestet. Im Vergleich mit der bisher genutzten Genotypisierung basierend auf der Core-Region erzielte die Genotypisierung mittels NS5A-Sequenzierung eine hohe Übereinstimmung von 97,3%. Resistenzen in NS5A (RAS's) konnten unter der Verwendung des Algorithmus Geno2Pheno_[HCV] bei 23 von 257 Patienten (8,9%) ermittelt werden.

Summary

A chronic hepatitis C Virus (HCV) infection is a serious disease which, if left untreated, can lead to severe liver disease and death. According to the World Health Organization (WHO) presently, 58 million people worldwide are chronically infected. The approval of *direct-acting antivirals* (DAA) revolutionized the previous HCV treatment regimens, achieving viral cure rates of more than 95% with a shorter treatment duration and a reduced side effect profile.

However, effective antiviral therapy in certain patient populations continues to be a major challenge. Based on the high viral heterogeneity, misidentified HCV genotypes and the increased occurrence of resistance-associated substitutions (RAS) in the non-structural protein 5A (NS5A) of the HCV replication complex. RAS in particular can limit the effectiveness of a therapy. Although NS5A inhibitors are the backbone of all currently approved DAA combination therapies, resistance tests are not routinely carried out. For optimal treatment management, correct identification of the HCV genotype is required ideally combined with genotypic resistance testing of the NS5A region, however, this is currently not done within the framework of standard diagnostics.

The aim of this thesis was to establish a pan-genotypic HCV-NS5A amplification method with a focus on reliable genotyping and simultaneous resistance testing for a faster and more economical diagnostic method. For this purpose, pan-genotypically degenerated PCR primers for genotypes 1-7 were designed and tested in 262 HCV patients. Compared to the previously genotyping procedure based on sequencing of the core region, genotyping by NS5A sequencing achieved a high concordance of 97,3%. Resistance in NS5A (RAS's) could be detected in 23 of 257 patients (8.9%) using the algorithm Geno2Pheno [HCV].

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter	ml	Mililiter
°C	Celsius	mM	Milimolar
AG	Aktiengesellschaft / Arbeitsgemeinschaft	MSM	Männer, die Sex mit Männern haben
Bp	Basenpaare	NANBH	Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis
CCD	engl. <i>charge-coupled device</i> Ladungsgekoppeltes Bauteil	NTR	Nicht translatierte Region engl. Polymerase-chain- reaction,
DAA	engl. <i>Direct-acting-antivirals</i> , Direkt wirkende Antiviren	PCR	Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribunukleinsäure	PIB	Pibrentasvir
dNTPS	Desoxyribonukleosid- Triphosphate	PWID	engl. people who inject drugs, Drogenkonsumenten
eG	Europäische Gemeinschaft	R	engl. <i>reverse</i> , rückwärts
EBR	Elbasvir	RNA	Ribonukleinsäure engl. <i>Revolutions per</i> <i>minute</i> , Umdrehungen pro Minute
F	engl. <i>forward</i> ,vorwärts	rpm	
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	RT	Reverse Transkriptase
GLE	Glecaprevir	SOF	Sofosbuvir engl. sustained virological response, anhaltende virologische Reaktion
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	SVR	
GT	Genotyp	USA	United States of America
GZR	Grazoprevir	VEL	Velpatasvir engl. <i>Virusidentification</i> ,
H2O	Chemische Summenformel für Wasser	VI	Virusidentifikation
HCV	Hepatitis C Virus	VL	Viruslast
IRES	Ribosomeneintrittsstelle	VOX	Voxilaprevir
KB	Kilobase		
LDV	Ledipasvir		
M DTT	Dithiothreitol		
min	Minuten		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatitis C Virus (HCV) Infektion.....	1
1.2	HCV-Transmission.....	2
1.3	HCV-Struktur	2
1.4	HCV-Genotypen.....	4
1.4.1	Entwicklungen in der HCV-Therapie.....	6
1.4.2	Aktuelle Therapiekombinationen.....	9
1.4.3	Problematiken im Therapieregime	10
1.4.4	Resistenzen in der HCV-Therapie	12
1.4.5	Die Besonderheit des Nicht-Strukturproteins 5A (NS5A).....	13
1.5	HCV-Diagnostik.....	14
2	Ziele dieser Arbeit	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Geräte	18
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3	Chemikalien und Enzyme.....	19
3.1.4	Kits	20
3.1.5	Oligonukleotide	21
3.1.6	verwendete Software.....	22
3.2	Patienten	22
3.3	Methode	23
3.3.1	Probenaufbereitung	23
3.3.2	Reverse Transkription von HCV-RNA.....	23
3.3.3	Nested PCR.....	25
3.3.4	QIAxcel® Advanced System	26
3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.3.6	DNA-Aufreinigung.....	27
3.3.7	Enzymatische DNA-Aufreinigung.....	28
3.3.8	Konzentrationsmessung.....	28
3.3.9	Sequenzierung.....	29

3.3.10	Sequenzanalyse	29
3.3.11	Geno2Pheno _[HCV]	29
3.3.12	Interactive Tree Of Life (iTOL)	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Primer-Design für eine pan-genotypische PCR	30
4.2	Amplifikation von NS5A mittels GoTaq Polymerase	31
4.3	Testung von Genotyp 1a Primer in Kombination mit universellen NS5A Primer	33
4.4	Amplifikation mit Primer 6852-R	35
4.5	Direkter Einsatz von cDNA als Template für die Amplifikation mit Hilfe von Genotyp 1a	36
4.6	Testung verschiedener Polymerasen zur Protokolloptimierung	37
4.7	Testung des optimierten Reverseprimer 6852-R	40
4.8	Etablierung eines Universalprimer-Protokolls	41
4.9	Effektivität der etablierten Primer-Kombination bei anderen Genotypen	42
4.10	Einfluss verschiedener Viruslasten auf die Effektivität der etablierten Primer-Kombination	43
4.11	Testung Amplifikation von Genotyp 4d	45
4.12	Optimierung des Primer-Protokolls hinsichtlich Genotyp 2	46
4.13	Einführung eines pan-genotypischen NS5A-PCR Protokolls	48
4.14	Übersicht der Effektivität des etablierten pan-genotypischen NS5A- PCR-Protokolls für die Genotypen 1-6	49
4.15	Analysen der HCV-Patienten-Kohorte am Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf	50
4.15.1	Verteilung der Viruslast innerhalb der Kohorte	50
4.15.2	Verteilung der Genotypen innerhalb der Kohorte	51
4.15.3	Verteilung der Resistenzen innerhalb der Kohorte	53
4.15.4	Vergleichsanalyse zu einem einstufigen pan-genotypischen NS5A Amplifikationsprotokoll	54
5	Diskussion	57
5.1	Etablierung einer pan-genotypischen Amplifikationsmethode der HCV NS5A-Region	58

5.2	Schwierigkeiten bei der Etablierung einer neuen Diagnostikmethode aufgrund der HCV-Heterogenität	59
5.3	Einfluss von Resistenz-assoziierten Substitutionen (RAS) auf den Therapieerfolg von Hepatitis C	61
5.4	Genotypisierung durch NS5A und Analyse mit Geno2pheno [HCV]	63
5.5	Methodenvergleich	64
6	Schlussfolgerung	66
7	Abbildungsverzeichnis	68
8	Tabellenverzeichnis.....	69
9	Literaturverzeichnis.....	70
10	Danksagung	78

1 Einleitung

1.1 Hepatitis C Virus (HCV) Infektion

Im Jahr 1975 wurde von Feinstone durch Forschung an Transfusions-assoziierten Hepatitiden nach Ausschluss einer Hepatitis A und Hepatitis B eine dritte, bisher unbekannte Form der Virushepatitis entdeckt [2]. Diese wurde als Nicht-A, Nicht-B-Hepatitis (NANBH) bezeichnet.

Knapp 15 Jahre später im Jahr 1989 wurde der NANBH auslösende Erreger von dem Wissenschaftler Choo [3] isoliert, und das positiv-strängige RNA-Virus wurde als dritte Klasse der Hepatitiden „Hepatitis C“ deklariert.

Nach der Identifizierung von HCV, konnte man schnell eine weltweite Verbreitung nachweisen. Aktuelle Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge, sind derzeit etwa 58 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert. Dies entspricht annähernd etwa 1% der gesamten Weltbevölkerung. Auch in Europa stellt die HCV-Infektion ein großes Problem des öffentlichen Gesundheitswesens dar. Etwa 14 Millionen Menschen, also eine von 50 Personen, sind zurzeit chronisch infiziert, was geschätzt etwa 20% der weltweiten HCV-Krankheitslast entspricht [4]. Trotz dieser hohen Zahlen finden Infektionen mit Hepatitis-Viren in der Öffentlichkeit nur eine geringe Beachtung. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass die Anzahl an Todesfällen durch eine Virushepatitis höher ist als die Zahl der Todesfälle durch HIV-Infektion, Tuberkulose oder Malaria [5, 6].

Eine HCV-Infektion differenziert sich in eine akute und in eine chronische Phase. Die akute Phase, definiert als die ersten sechs Monate nach Infektionsbeginn, verläuft für gewöhnlich weitgehend asymptomatisch. Bei 15-45% der infizierten Patienten treten innerhalb dieser ersten sechs Monaten, ohne eine zusätzliche Therapie, Spontanremissionen auf. Besteht die Infektion bei den übrigen 55-85% der Erkrankten länger als sechs Monate, wird sie als chronisch definiert, von denen sich weniger als ein Drittel in der europäischen Region ihrer Infektion bewusst sind. Mit einer nicht behandelten chronischen HCV-Infektion sterben jährlich 112.500 Menschen an den resultierenden Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose, Leberfibrose oder einem hepatozellulären Karzinom. Es wird geschätzt, dass ca. 35% der Leberzirrhosen und 32% der Leberkarzinome so wie die Indikationen zur

überwiegenden Anzahl von Lebertransplantationen in Europa auf eine HCV-Infektion zurückzuführen sind [4, 7, 8].

Laut dem Robert-Koch-Institut schwankt die Inzidenz und Prävalenz innerhalb der einzelnen europäischen Länder jedoch stark [9].

Bedingt durch ein außerordentlich hohes Maß an genetischer Variabilität von HCV, stellt die Entwicklung von Impfstoffen, sowie auch von pan-genotypischen Arzneimitteltherapien eine große Herausforderung dar [10].

1.2 HCV-Transmission

HCV wird vor allem durch Blut übertragen. Infektionen sind durch berufliche (medizinische) Tätigkeiten, perinatale (während des Geburtsvorgangs bei einer infizierten Mutter auf ihr Kind) oder durch Gebrauch von benutzten und kontaminierten Nadeln möglich. HCV wird allerdings nicht durch Muttermilch, Nahrung und Wasser oder durch gelegentlichen Kontakt, wie Umarmung, Küssen oder Teilen von Speisen oder Getränken mit einer infizierten Person übertragen [4]. Auch sexuelle Kontakte spielen nur dann für die Übertragung eine Rolle, wenn über Schleimhautläsionen Kontakte zu Blut möglich sind.

Perkutane Expositionen, beispielsweise bei Tätowierungen oder intravenösem Drogenkonsum, hier insbesondere durch „*Needle Sharing*“, stellen gemeinsam mit Folgen von invasiv-medizinischen Prozeduren und infizierten Blutprodukten, sowie einer hohen Promiskuität in der Gruppe der Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), den größten Risikofaktor einer HCV-Übertragung dar [4, 11].

1.3 HCV-Struktur

Das Hepatitis C Virus ist der Familie der *Flaviviridae* zugehörig, in welcher es aufgrund seiner Genomstruktur und Organisation, sowie seinen physikochemischen Eigenschaften eine eigene Gattung *Hepacivirus* bildet [9].

Diese Viren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität, welches eine Länge von ~9600 Nukleotiden aufweist. Das Hepatitis C Virus kodiert für einen einzelnen offenen Leserahmen. Das jeweilige 5'- und 3'-Ende der RNA ist regelmäßig von hochgradigen Strukturen, sogenannten nicht-translatierten Regionen (NTR), flankiert, welche für die RNA-Replikation essentielle Funktionen übernehmen.

Bei der Replikation dienen die 5'-NTR Bindungsstellen gleichzeitig auch als interne Ribosomeneintrittsstellen (IRES), welche die Synthese eines etwa 3000 Aminosäuren langen Polyproteins vermittelt. Darüber hinaus bindet hier die leberspezifische micro-RNA (mir)-122. Die Bindung an das virale Genom führt zu einer Translations- und Replikationssteigerung mit der Besonderheit, dass die üblichen micro-RNAs die Expression von Genen reduzieren und nicht, wie bei HCV, steigern [12].

Das virale Polyprotein wird durch zelluläre und virale Proteasen in drei Strukturproteine (Core, E1 und E2) und insgesamt sieben Nichtstrukturproteine (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B) gespalten, wobei die Strukturproteine als Bestandteile des Viruspartikels und die Nichtstrukturproteine als Bestandteile des Replikationskomplexes an der Virusvermehrung beteiligt sind. Die Nichtstrukturproteine p7 und NS2 dienen zur Unterstützung der Virusmontage; sie sind höchstwahrscheinlich nicht Teil des Virions [13, 14].

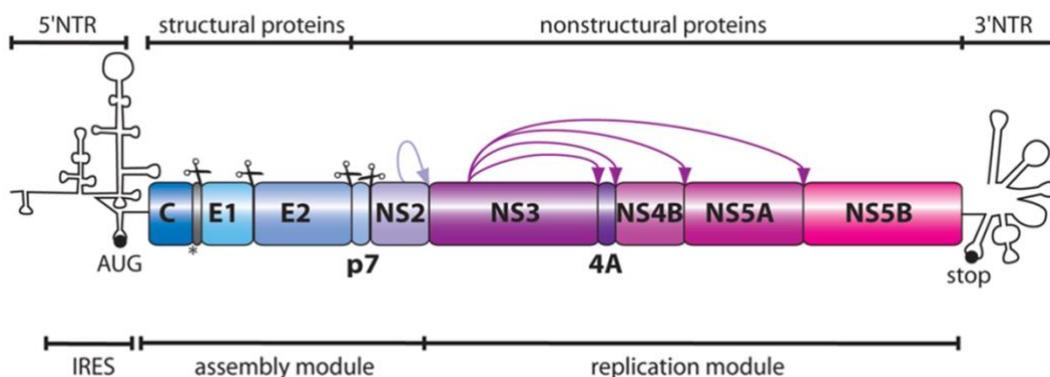


Abbildung 1: Strukturübersicht des HCV Genoms

Schematische Illustration der viralen Genomstruktur. Die RNA-Enden mit 5'- und 3'-NTRs sind in ihren Sekundärstrukturen abgebildet. Das Startcodon des Polyproteins (AUG), sowie das Stoppcodon (stop) sind angedeutet. Die Scheren und Pfeile symbolisieren die durch diverse Proteasen vermittelte Polyproteinspaltstellen. Das Sternchen in der Kapsidregion steht für eine Signalpeptid-Peptidase-Spaltstelle. IRES = Interne Ribosomeneintrittsstelle. Modifiziert nach [12] und Abbildung entnommen aus [14].

1.4 HCV-Genotypen

Aufgrund einer sehr hohen Replikationsrate und dem Fehlen der Korrekturlesefunktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (NS5B), zeichnet sich das Hepatitis C Virus durch eine sehr hohe genetische Heterogenität aus [12, 15].

Ende der 90er wurde von Simmonds [16] daher ein einheitliches Konzept zur Klassifikation von HCV vorgeschlagen. Es umfasst Kriterien zur Einteilung und Identifikation, der zum damaligen Zeitpunkt bekannten Genotyp-Variationen. Die Zuordnung von Geno- und Subtypen basieren nach wie vor auf diesem Konzept:

1. Eine oder mehrere vollständige Sequenzen der codierenden Region müssen vorhanden sein.
2. Mindestens drei epidemiologisch nicht verwandte Isolate sind erforderlich.
3. Eine phylogenetische Abzweigung, die sich von zuvor beschriebenen Sequenzen unterscheidet, muss vorliegen.
4. Eine intergenotypische oder intersubtypische Rekombination, unabhängig davon, ob die Komponenten klassifiziert wurden oder nicht, muss ausgeschlossen sein.

Die Einführung dieser einheitlichen Kriterien und der Nomenklatur umfasste sechs Genotypen, 18 bestätigte Subtypen und 58 vorläufig bestätigte Subtypen und diente als Ausgangslage der heutigen HCV-Therapieforschung [17]. Die Weiterentwicklung von Nukleotid-Sequenzierungs-Technologien und einem zunehmenden Fokus auf die Rolle der genetischen Variation von HCV in der Symptomatik und im Therapie-Outcome, haben die ursprüngliche Klassifikation von Simmonds erweitert. Seit 2013 sind es offiziell 7 Genotypen und 67 bestätigte Subtypen [17, 18].

Es wird geschätzt, dass eine Fehlerrate bei 10^{-3} -Basen-Substitution pro Nukleotid liegt [19]. Zusammen mit einem Umsatz von ca. 10^{12} Virionen pro Tag führt dies zu einem sehr heterogenen Pool an Viren in einem jeweilig infizierten Individuum [20]. Diese Mischung zirkulierender verwandter Genome innerhalb eines einzelnen Individuums wird als Quasispezies bezeichnet. Durch das Vorhandensein diverser Genomvarianten und der hohen Replikationsrate weiterer Varianten besitzt diese HCV-Quasispezies einen signifikanten Anpassungsvorteil an Umweltbedingungen [21].

Durch Bestimmung der genetischen Distanz und Phylogenie konnten aufgrund der HCV-Sequenz-Variabilität verschiedene Genotypen, mit Unterschieden in 30-33%

der Nukleotidsequenz, eingeteilt werden. Die etwa gleich weit entfernten genetischen Stämme beherbergen jeweils eng verwandte, dennoch genetisch unterschiedliche Subtypen, welche bis zu 15% in den Nukleotidsequenzen variieren können [17, 22]. Die beschriebenen Genotypen zeigen eine deutliche geographische Verteilung, sowie eine Korrelation in Bezug auf Geschlecht, Alter und Übertragungsweg [8] [17](Abb.2).

Global wird Genotyp 1 für 46,2% der HCV-Fälle verantwortlich gemacht und weist somit die höchste Prävalenz auf. Mehr als ein Drittel ist hierbei in Ostasien lokalisiert. Es wird davon ausgegangen, dass die globale Verteilung von Genotyp 1, insbesondere der Subtypen 1a und 1b, in Assoziation mit der internationalen Verbreitung von kontaminierten Blut und Blutprodukten während des zwanzigsten Jahrhunderts zu sehen ist [23].

Der HCV-Genotyp 3 ist der zweithäufigste Genotyp und wird auf circa 30% der Fälle weltweit geschätzt, von denen etwa drei Viertel in Südostasienvorkommen. In Westeuropa wird der Subtyp 3a mit hoher Korrelation durch den Injektionsdrogenkonsum und Tätowierungen in Verbindung gebracht [8, 24].

Die Genotypen 2, 4 und 6 sind mit 9,1%, 8,3% und 5,4% für die verbleibenden Fälle weltweit verantwortlich. Im ostasiatischen Raum sind Genotyp 2 und Genotyp 6 vermehrt zu finden, während im nordafrikanischen Raum und Nahen Osten der Genotyp 4 dominiert. Die wenigsten Fälle sind dem Genotyp 5 (1,4 Millionen, <1%) zuzuschreiben, welche im östlichen Afrika und südlich der Sahara auftreten. Im Jahr 2015 wurde erstmals bei vier Patienten aus der Demokratischen Republik Kongo eine neue Genom-Sequenz als Genotyp 7a beschrieben [18].

Die globale Verbreitung von genetischen Varianten lässt sich im Allgemeinen durch historische Einflüsse wie die Kolonialisierungen, Sklavenhandel und durch aktuelle Trends der menschlichen Migration erklären [25].

Die Genotypen unterscheiden sich jedoch nicht nur durch ihr globales Auftreten, sondern auch im Ansprechen auf Therapeutika [10]. Dies stellt für die Herstellung einer effektiven antiviralen Therapie eine Herausforderung dar [26] und muss auch bei der Etablierung einer neuen Diagnostikmethode beachtet werden, da auch unter den aktuellen Behandlungsschemata noch einige auf individuelle Genotypen zugeschnitten werden [27].

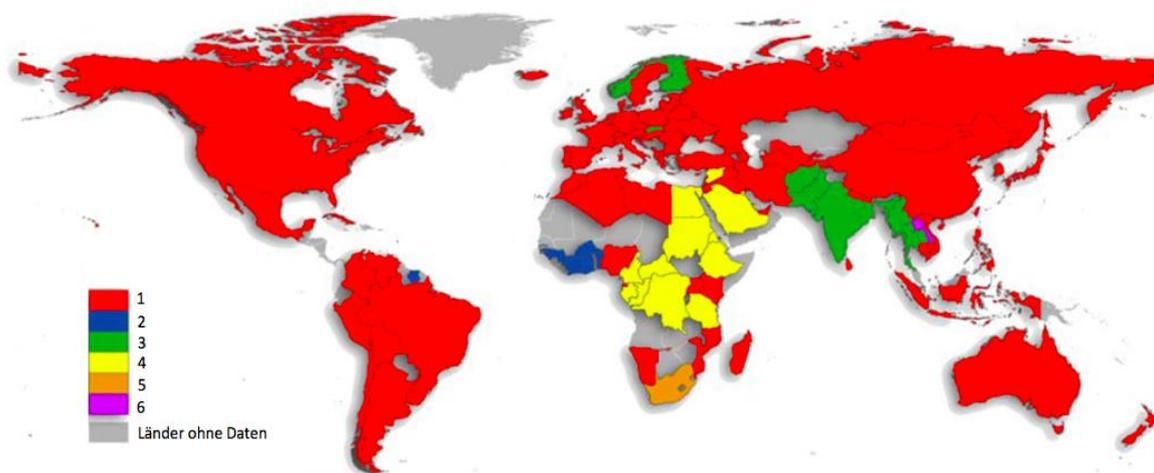


Abbildung 2: Übersicht globale Genotyp Verteilung von HCV

Zu sehen ist eine Weltkarte, welche die globale Genotypverteilung von Hepatitis C widerspiegelt. Die Länder sind nach dem mehrheitlich auftretenden Genotyp aus den zugehörigen Studien von Messina [10] in farbliche Gruppen zusammengefasst. Genotyp 1 (rot, 46,2%) ist international am meisten verbreitet, gefolgt von Genotyp 3 (grün, 30,1%), Genotyp 2 (blau, 9,1%), Genotyp 4 (gelb, 8,3%), Genotyp 6 (pink, 5,4%) und Genotyp 5 (orange, <1%). Abbildung entnommen aus [10].

1.4.1 Entwicklungen in der HCV-Therapie

Positiv-Strang-RNA-Viren lösen aufgrund der Notwendigkeit einer fortlaufenden Replikation zur Selbsterhaltung in einem Wirt eher akute, selbst-limitierende als persistierende Infektionen aus. Durch die konstante Produktion von Antigenen sind sie für die adaptive Immunität daher in der Regel ein leichtes Ziel. Dies trifft für HCV-Infektionen jedoch nicht zu [26].

Die Herstellung einer effektiven antiviralen Therapie stellt aufgrund der hohen Heterogenität des HCV-Genoms eine große Hürde dar. Bereits vor der Identifikation des Hepatitis C-Virus wurden ersten Therapieansätze 1986 mit rekombinantem humanem Interferon- α getestet [28]. In den 90er Jahren wurde eine Interferon- α Monotherapie für einen Therapiezeitraum von 48 Wochen zugelassen. Hierunter sah man Heilungsraten von 15-40%. Die vergleichsweise geringe Heilungsrate erklärte man sich durch Unterschiede der viralen Genotypen [26]. Zur Erhöhung der Ansprechrate wurde im Jahr 1998 die auf Interferonbasierende Therapie um das Nukleosid-Analogon *Ribavirin* erweitert. Eine weitere Verbesserung der Therapie sah man in der Modifikation von Interferon- α mit Polyethylenglycol (PEG) im Jahr 2002 [29]. Durch die Änderung der Interferon-Therapie erhöhte sich die Heilungsrate von

Infektionen mit den Genotypen 1, 4, 5 und 6 auf circa 50%, bei den Genotypen 2 und 3 wurde allerdings eine Heilungsrate bis zu 90% erreicht. Neben der Viruslast und der viralen Kinetik waren individuelle Patienteneigenschaften, wie das Vorliegen einer *Steatosis Hepatis*, einer *Leberfibrose*, des Alters oder des weiblichen Geschlechtes, die Therapiedauer beeinflussende Faktoren. Ein Nebeneffekt der langen Therapiedauer (24-48 Wochen) waren jedoch starke Nebenwirkungen aus dem psychiatrischen Formenkreis, Schwindel, Anämien und grippeartige Symptome. Diese unerwünschten Nebenwirkungen führten zu vielen Therapieabbrüchen mit entsprechendem Therapieversagen [29, 30].

Der Wunsch, diese Nebenwirkungen zu reduzieren und ein anhaltendes virologisches Ansprechen („*sustained virological response*“, SVR) im Vergleich zur etablierten Interferon-Therapie zu erzielen, führte zur Entwicklung von DAAs (direct acting antivirals), welche eine direkte Virushemmung bewirken [31, 32].

Die Grundlage der Entwicklung der direkt antiviral wirksamen Substanzen (DAAs) basiert auf dem sogenannten „Replikon-System“ [33], einem Zellkulturmodell (siehe 1.3), das durch die molekulare Klonierung des viralen Genoms ermöglicht wurde. Das Virus konnte nun in einfach kultivierbaren humanen Zellen vermehrt und untersucht werden [32]. Der ausschlaggebende Forschungsfortschritt war die Entwicklung von selbst-replizierenden subgenomischen RNAs, sogenannte Replikons, welche die für die Genomreplikation verantwortlichen Nichtstrukturproteine (NS3-5) beinhalteten [33]. Die Verwendung der Replikons ermöglichte somit eine effiziente Testung diverser DAAs [34].

Die Entschlüsselung wesentlicher Funktionen der HCV-Proteine lieferte einen weiteren substantiellen Beitrag zur Entwicklung moderner Therapieverfahren [32]. Hierzu zählt die Entwicklung von Polymerase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren und NS5A-Inhibitoren. Das Prinzip der HIV-Kombinationstherapie wurde dabei auf die HCV-Therapie übertragen. Durch Kombination mehrerer potenter Wirkstoffe mit nicht überlappenden Resistenzen, ist eine schnelle Unterdrückung der viralen Replikation und Vermeidung viraler Resistenzbildungen möglich gewesen [35].

Durch Lamarre et al. [36] konnte Anfang 2000 in einer randomisierten, doppelblinden „*Proof-of-Concept*“-Studie mit Placebo-Kontrollen die Wirksamkeit von NS3-Proteaseinhibitoren bei HCV-Genotyp 1 Infizierten nachgewiesen werden. Dies galt als revolutionärer Schritt, die darauffolgende Erweiterung der bis dato etablierten Therapiekombination bestehend aus Peg-Interferon- α und Ribavirin mit

Proteasehemmern, steigerte die SVR von 45% auf ca. 75% und betätigte somit die Wirksamkeit von Protease-Inhibitoren [35].

Dieser Therapieansatz mit Hemmung der proteolytischen Spaltung der viralen Protease NS3-4 als Zusatz zur etablierten Interferon-Therapie wurde 2011 zugelassen. Diese erste Substanzklasse der DAAs, erhielt die Endung „-previr“. Im Jahr 2013 folgte die Zulassung der NS5B-Polymerasehemmer mit der etablierten Endung auf „-buvir“, welche gezielt die virale RNA inhibieren. Mit der Endung „-asvir“ wurden 2015 die ersten NS5A-Inhibitoren mit dem Angriffsort der Regulation der Virusreplikation zugelassen[32].

Aufgrund des sehr guten Ansprechens der Therapie-Regime basieren gegenwärtige Therapien auf einer Interferon-freien Kombination dieser drei Inhibitor-Klassen [26]. In einem Zeitraum von etwa 30 Jahren ist es somit möglich gewesen, eine ausschließlich orale, Interferon-freie Therapie mit geringen Komplikationen und einer hohen Effektivität zur Therapie der chronischen Hepatitis C-Infektion zu entwickeln.

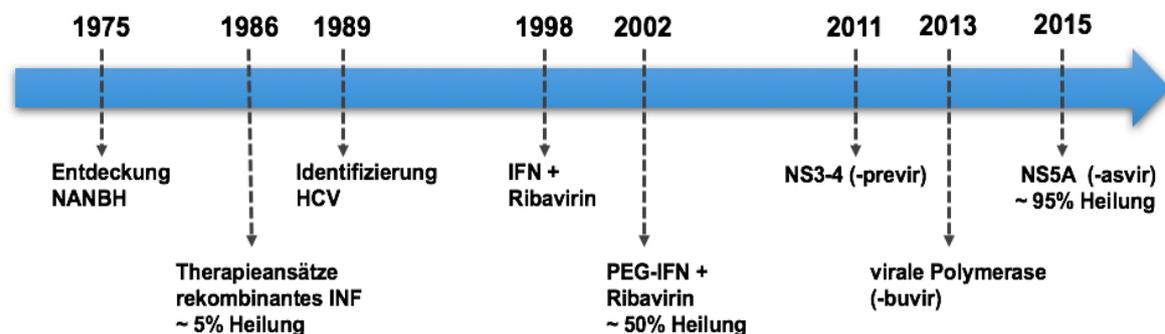


Abbildung 3: Historische Erfolge in der HCV-Therapie

Die ersten Entwicklungsansätze der HCV-Therapie entstanden in den 1980er, als unklare Leberentzündungen im Zusammenhang mit Bluttransfusionen, nicht durch Hepatitis A- oder B-Virusinfektionen erklärt werden konnten. Diese sogenannten NANBH-Fälle wurden mit einer Erfolgsrate von circa 5% mit rekombinantem Interferon therapiert. 1989 wurde das RNA-Virus Hepatitis C als Ursache dieser Infektionen identifiziert. Die erste zugelassene Therapie mit PEGyliertem Interferon (PEG-IFN) und Ribavirin erzielte eine Genesung von etwa 50%. Um die Heilungsraten zu optimieren wurden verschiedene Medikamentenkombinationen mit DAAs (direct-acting antivirals) getestet. Zwischen 2011 und 2015 gelang der Fortschritt mit der Etablierung von drei Inhibitor-Klassen, eine orale Interferon-freie Therapiekombination mit Erfolgsraten von >95% zu entwickeln. Modifiziert nach [30, 35].

1.4.2 Aktuelle Therapiekombinationen

Eine antivirale Therapie sollte jedem Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion empfohlen werden [7, 27]. Um eine hohe Heilungsrate bei geringerer Therapieintensität zu erzielen, sollte eine Therapie so früh wie möglich begonnen werden. Durch einen frühen Therapiebeginn lässt sich das Risiko für morphologische Veränderungen der Leber und Entwicklungen extrahepatischer Manifestationen der HCV-Infektion reduzieren. Hiermit lässt sich ebenfalls die mit der chronischen HCV-Infektion verbundene Morbidität und Letalität verringern. Ferner lässt sich durch einen frühen Therapieansatz der sogenannte „point of no return“ der Erkrankung verhindern, wobei es sich um ein Stadium handelt, in dem die HCV-assoziierten Komplikationen, trotz viraler Elimination, irreversibel sind [7].

Es stehen mehrere Behandlungsoptionen zur Verfügung. Diese basieren auf der Grundlage des HCV-Genotyps, möglicher Vortherapien und dem Zirrhose-Stadium der Patienten. Bei der Wahl der richtigen Therapie sind folgende Faktoren zu beachten: das Erreichen eines anhaltenden virologischen Therapieansprechens, die vollständige Viruselimination (SVR) und die damit assoziierte Therapiedauer, sowie die Neigung zu Resistenzen und zum Auftreten potentieller Nebenwirkungen bzw. Kontraindikationen [7, 32].

Die Entwicklung einer optimalen HCV-Therapie mit Pan-Genotypischen-Wirksamkeit, statt Genotyp-spezifischen-Konzepten entfachte einen beispiellosen Medikamentenwettkampf zwischen den Pharmazieunternehmen. Die aktuelle Standardtherapie für HCV besteht aus der Kombination mehrerer antiviral wirkender Substanzklassen (DAA), vorzugsweise oral verabreicht, verbunden mit Therapiekosten bei der Zulassung zwischen 26.000 und 60.000 Euro. Heute findet Interferon hierbei keine standardmäßige Verwendung mehr. Heilungsraten von über 95% sind bei einem richtig ausgewählten Therapiekonzept erreichbar [32].

Mit einer anhaltenden Viruselimination (SVR) gilt ein Patient als geheilt, welche mit einem negativen HCV-RNA-Nachweis mittels Realtime-PCR 12 Wochen nach Beendigung einer antiviralen Therapie nachgewiesen wird. Da ein negativer HCV-RNA-Nachweis als Pendant zur SVR gilt, wird die Viruslastkontrolle im klinischen Alltag mit SVR10 angegeben [32].

Die für die einzelnen Genotypen zugelassenen Präparate, wie auch die Wirkstoffe und die dazugehörige Einnahmedauer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Patienten sind nach ihrem Behandlungsstatus in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei „TE“ für Therapie-erfahren (Vorbehandlung mit (PEG)-Interferon- α und Ribavirin) und „TN“ für Therapie-naiv (Erstbehandlung) steht.

Tabelle 1: Übersicht der aktuellen Therapie Empfehlungen für HCV-Monoinfizierte Patienten mit und ohne kompensierte Zirrhose (Therapiedauer in Wochen)

GT	Patienten	Handelsname									
		Maviret®		Eplclusa®		Harvoni®		Vosevi®		Zepatier®	
		GLE/PIB		SOF/VEL		LDV/SOF		SOF/VEL/VOX		EBR/GZR	
		Ø Z	Z	Ø Z	Z	Ø Z	Z	Ø Z	Z	Ø Z	Z
1a	TN	8	12	12	12	8-12	12	8	12	X	X
	TE	8	12	12	12	X	X	12	12	X	X
1b	TN	8	12	12	12	8-12	12	8	12	12	12
	TE	8	12	12	12	12	12	12	12	12	12
2	TN	8	12	12	12	X	X	8	12	X	X
	TE	8	12	12	12	X	X	12	12	X	X
3	TN	8	12	12	12	X	X	8	8	X	X
	TE	12	16	12	12*	X	24*	12	8	X	X
4	TN	8	12	12	12	12	12	8	12	X	X
	TE	8	12	12	12	X	X	12	12	X	X
5	TN	8	12	12	12	12	12	8	12	X	X
	TE	8	12	12	12	X	X	12	12	X	X
6	TN	8	12	12	12	12	12	8	12	X	X
	TE	8	12	12	12	X	X	12	12	X	X

TN = Therapie-naiv; TE = Therapie-erfahren; Ø Z = HCV-Infektion ohne Zirrhose; Z = HCV-Infektion mit kompensierter Zirrhose (Child-Pugh A); X = keine Zulassung; GLE = Glecaprevir; PIB = Pibrentasvir; SOF = Sofosbuvir; VEL = Velpatasvir; LVD = Ledipasvir; VOX = Voxilaprevir; EBR = Elbasvir; GZR = Grazoprevir; * = + Ribavirin (einschließlich Patienten mit kompensierter Zirrhose und/oder Versagen einer vorherigen Behandlung). Modifiziert nach [37-40]

1.4.3 Problematiken im Therapieregime

Seit der Einführung von DAAs in die HCV-Therapie und der daraus resultierenden Reduzierung von Nebenwirkungen, konnte die Lebensqualität der Patienten erheblich verbessert werden. Dennoch gestaltet sich eine erfolgreiche antivirale Behandlung in bestimmten Patientengruppen als schwierig [32, 41]. Eine Problematik

bei der Therapieplanung ist die Tatsache, dass alle Patienten individuell betrachtet werden müssen und gegebenenfalls vorhandene Komorbiditäten einen Therapieerfolg negativ beeinflussen können. Je nach Begleiterkrankung muss im klinischen Setting die richtige DAA-Kombination gewählt werden.

Für Patienten mit einer dekompensierten Leberzirrhose sind aktuell Therapiekombinationen mit Sofosbuvir und NS5A-Inhibitoren empfohlen. Das HCV-Protein NS5A übernimmt eine Schlüsselkomponente im HCV-Replikationszyklus und stellt somit, obwohl genaue Wirkweisen noch unzureichend erforscht wurden, einen essentiellen Angriffspunkt in der Therapie einer chronischen HCV-Infektion dar (siehe 1.4.5) [42]. Aufgrund des eingeschränkten hepatischen Metabolismus und der höheren Begleitmedikation dieser Patientengruppe sind Protease-Inhibitoren kontraindiziert. Die limitierte Therapiemöglichkeit kann allerdings durch die Zugabe von Ribavirin ergänzt und so die Effektivität gesteigert werden [27, 43].

Während Sofosbuvir bei Lebererkrankungen sehr effektiv und gut vertragen wird, ist die Wirksamkeit sowie der nachgewiesene sichere Einsatz bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen nicht vollständig gegeben. Aufgrund einer erhöhten Exposition gegenüber aktiver Metaboliten von Sofosbuvir bei eingeschränkter Nierenfunktion [44], sollte der Polymerase-Inhibitor bei einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 30 ml/min nicht verabreicht werden. Ribavirin wird bei Niereninsuffizienz ebenfalls schlecht vertragen und Dosisanpassungen und Therapieabbrüche sind daher oft die Folge. Bei Patienten mit terminalem Nierenversagen sollte daher auf eine Sofosbuvir-freie Medikamentenkombination zurückgegriffen werden. Diverse Pan-Genotyp-Kombinationen erwiesen sich in klinischen Phase-III-Studien als effizient [45].

Viele weitere Faktoren, wie Hepatitis B (HBV) und HIV als Koinfektionen und den damit einhergehenden opportunistischen Infektionen, dem metabolischen Syndrom, sowie eine Alkohol- und Nikotinabhängigkeit, beeinträchtigen einen optimalen Therapieerfolg [11]. Folglich sind Komorbiditäten mit einer signifikant schlechteren Prognose und einem erhöhten Komplikationsprofil vergesellschaftet [7].

Unabhängig vom allgemeinen Therapiefortschritt, bestehen neben der Therapie schwieriger Patientengruppen nach wie vor diverse Herausforderungen, welche einer globalen Eradikation des Hepatitis C-Virus im Wege stehen [32, 46].

Bisher gab es keine Empfehlung für ein allgemeines Screening auf HCV-Infektionen, sodass viele Infektionen nicht oder erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium

diagnostiziert werden und sodass Infizierte in Unkenntnis ihrer Infektion das Virus verbreiten können. Zudem sind Re-Infektionen ebenfalls problematisch, denn eine erfolgreich beendete HCV-Therapie bietet für Patienten keinerlei immunologischen Schutz vor einer erneuten Ansteckung [35].

1.4.4 Resistenzen in der HCV-Therapie

Die Behandlung von chronischen Hepatitis C-Infektionen hat sich seit der Zulassung von DAAs im Jahr 2014 wesentlich verbessert. Dennoch kommt es bei 1-15% der Patienten, je nach Patientengruppe und Behandlungsschema zu einem Therapieversagen. Die Gründe hierfür sind unterschiedlich. Entscheidend für einen Therapieverlauf sind zum einen der genetische Hintergrund, sowie der individuelle DAA-Metabolismus der Patienten und zum anderen die Therapietreue, wie auch Vor- und Folgeerkrankungen der Virusinfektion. Beim Versagen einer effektiven Behandlung zeigen sich oftmals Resistenzen gegen direkt wirkende Virostatika [47]. HCV-Infizierte Patienten weisen eine komplexe Mischung genetisch unterschiedlicher, jedoch eng verwandter Isolate mit verschiedener Sequenz auf (siehe 1.4) dabei koexistieren die Virusvarianten in einem Gleichgewicht. Die jeweils einzelnen Varianten sind von ihren Replikationskapazitäten ihrer Wirtsumgebung (genannt „Fitness“) abhängig. Änderungen dieser Umgebung können das Gleichgewicht verändern und es kommt zu einer Umverteilung der Quasispezies-Population [47, 48].

Die Unterschiede in den Virusvarianten basieren auf Mutationen, die aufgrund einer fehlenden Korrekturlese-Funktion der viralen Polymerase während der HCV-Replikation entstehen. Mutationen mit förderndem Einfluss auf die virale Fitness von HCV können in die Viruspopulation mit aufgenommen werden. Folglich kann sich das Virus daraufhin an Veränderungen anpassen und unter laufender Therapie, können sich Resistenzen gegen das angewandte Behandlungsregime entwickeln [47, 49].

Unter dem Einsatz von DAAs werden erfolgreich virale Varianten, die mit einer reduzierten Suszeptibilität für das jeweilige Medikament und somit einer viralen Resistenz einhergehen, selektiert [47]. Vollständige Hemmungen von DAA-empfindlichen Wildtypviren erweitern den Replikationsraum im Folgenden so, dass Varianten mit reduzierter Empfindlichkeit über diese hinauswachsen können und sich somit die Fitness der resistenten Varianten erhöht. Diese „sekundären Aminosäuresubstitutionen“ oder auch „fitnessassoziierten Substitutionen“ genannt,

können natürlicherweise vorhanden sein oder während der Replikation des resistenten Virus entstehen und beschleunigen dadurch die Bildung von „Resistenz-assoziierten Substitutionen“ (RAS). Virale Varianten, die RAS beinhalten und folglich eine reduzierte Empfindlichkeit für DAAs aufweisen, werden „resistente Varianten“ genannt. Während einer Therapie sind sie für eine erhöhte Viruslast und folglich auch für ein Therapieversagen verantwortlich [47]. Diese Erkenntnis wurde für alle zugelassenen DAAs-Kombinationen RASs *in vivo* beschrieben [31, 50]. Zudem konnte klinisch festgestellt werden, dass die Entstehung von Resistenzen sich nicht nur zwischen DAA-Klassen unterscheiden, sondern dass es auch klinisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Geno- und Subtypen gibt [51, 52].

Somit ist noch nicht abschließend geklärt, ob RAS zukünftig in HCV-Therapien ein klinisches Problem darstellen und zunehmend einen Behandlungserfolg beeinträchtigen könnten [49].

1.4.5 Die Besonderheit des Nicht-Strukturproteins 5A (NS5A)

Im Zuge der Medikamentenentwicklung haben sich drei Hauptangriffsziele für eine selektive antivirale Therapie gegen Hepatitis C etabliert: die NS3/4A Protease, die NS5B-RNA-abhängige RNA-Polymerase und das Nichtstrukturprotein 5A, dem man bis heute keiner enzymatischen Funktion zuordnen konnte [12].

Bei dem membranassoziierten Nichtstrukturprotein 5A handelt es sich um ein Protein, welches nach erfolgter Phosphorylierung essentiell für die Synthese von der viralen RNA und dessen Virusassemblierung ist. Es wird angenommen, dass der Phosphorylierungsstatus, der unter anderem durch die zellulären Enzyme Casein Kinase I alpha und Casein Kinase II reguliert wird, das Umschalten von RNA-Replikation auf Viruszusammenbau steuert [12, 26]. Die detaillierten Wirkmechanismen von NS5A im HCV-Replikationszyklus sind bisher unbekannt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass sich adaptive Mutationen in der zentralen Region von NS5A im Replikonsystem ansammeln [53, 54].

Die Erkenntnis um die Modulation der NS5A-Hyperphosphorylierung und ein besseres Verständnis der Nichtstrukturproteine 3, 4A und 4B stützt die Hypothese, dass NS5A eine wesentliche Komponente des HCV-Replikationskomplexes darstellt [55]. Obwohl der genaue Wirkmechanismus der NS5A-Inhibitoren nach wie vor unzureichend bekannt ist, hat sich die klinische Verwendung von NS5A-Inhibitoren als wirksam erwiesen [42].

Der NS5A-Inhibitor *Daclatasvir*, als Beispiel dienend, erzielte bereits in Pilotversuchen durch Blockierung der Ansammlung und Freisetzung von Viruspartikeln, nach nur 48 Stunden eine für mehrere Tage anhaltende Senkung des viralen Titers um das Vierfache [56, 57]. Zudem blockieren Daclatasvir-artige Inhibitoren, wahrscheinlich durch eine Inhibition der Multimerisierung von NS5A, die Bildung neuer membranöser viraler RNA-Replikationskomplexe [42, 58]. NS5A-Inhibitoren werden als einzige Klasse der HCV-Inhibitoren, in allen Behandlungsschemata aufgeführt [46].

1.5 HCV-Diagnostik

Seit der Einführung von Kombinationstherapien mit direkt antiviral wirkenden Substanzen (direct acting antivirals, DAA) haben sich die HCV-Behandlungsmöglichkeiten stark verbessert. Ein anhaltendes virologisches Ansprechen (sustained virological response, SVR) von 50% bei herkömmlichen Interferon-basierten Therapien erhöhte sich durch die Anwendung von Interferon-freien Kombinationen mit direkt wirkenden antiviralen Medikamenten bis > 95% [31]. Obwohl Medikamente zugelassen wurden, die gegen alle HCV-Genotypen wirken, spielt der HCV-Genotyp weiterhin für die Therapieplanung eine wichtige Rolle, so dass eine Fehlklassifizierung des Genotyps zu einem Therapie-Versagen führen kann [59]. Neben dem Genotyp ist für die Therapie unter anderem auch die Viruslast und bei Therapieversagern das Vorhandensein von Resistenzmutationen von Bedeutung [60]. Das Vorgehen in der Diagnostik von Hepatitis C beinhaltet zuerst eine Viruslastbestimmung im Patientenserum, gefolgt von einer Genotypisierung. Bei den meisten Patienten kann bei ausreichender Therapiedauer das HCV-Virus eliminiert werden. Bei Behandlungsabbrüchen, sei es durch Therapieversagen oder durch einen Rückfall, sind viele Virusvarianten der Quasispezies gegenüber eines oder mehreren Medikamenten resistent. Es treten fast immer so genannte Resistenz-assoziierte Substitutionen (RAS) auf (Abbildung 4). Nach der Behandlung lassen sich RAS gegen Nicht-Strukturprotein-3-Proteaseinhibitoren bei den meisten Patienten innerhalb weniger Wochen bis Monaten nach Therapie nicht mehr nachweisen. Der Ersatz durch Wildtyp-Viren kann bei unzureichender Therapie auf die Persistenz von Wildtyp-Viren in der Leber oder auf das Vorhandensein von spontanen Mutationen resistenter Viren zurückgeführt werden. Genomvarianten, welche Resistenzen gegen Inhibitoren des Nicht-Strukturprotein-5A aufweisen, können jedoch bis zu mehreren

Jahren nach Behandlungsversagen persistieren. Entweder weil sich von Natur aus fitter sind als die Wildtyp-Viren oder weil aus genetischen Gründen eine Rückkehr zum Wildtyp nicht möglich ist [47].



Abbildung 4: Übersicht des HCV-Genoms

Die Struktur Proteine lassen sich einteilen in core, E1, E2. Während sich die Nicht-Struktur Proteine in p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B einteilen. Die Resistenz-assoziierten Varianten manifestieren sich in den rot dargestellten Virusproteinen. Modifiziert nach [61].

In der aktuellen Routinediagnostik wird zur Genotypisierung zuerst die Core Region amplifiziert und anschließend sequenziert, um heraus zu finden, welche Medikamentenkombination für eine erfolgreiche HCV-Therapie in Betracht gezogen werden sollte. Bei Patienten mit schwierig zu behandelnden Genotypen oder bei bereits erfolglos vorbehandelten Patienten, wird zusätzlich eine Resistenzbestimmung der Nicht-Strukturproteine durchgeführt. Diese Resistenz-assoziierte Varianten können mit einem erhöhten Risiko für ein Therapieversagen von bestimmten Medikamentenkombinationen in Verbindung gebracht werden [62]. Um die relevanten Bereiche NS3, NS5A und NS5B abzudecken, werden momentan die jeweiligen Nicht-Strukturprotein-Regionen einzeln amplifiziert und sequenziert (Abbildung 5). Die Materialkosten einer Genotypisierung und Resistenztestung betragen circa 80€ pro Patient. Da sowohl für die Genotypisierung wie auch für die Resistenztestung Bereiche des HCV-Genoms amplifiziert und sequenziert werden, liegt es nahe, diese beiden getrennten Abschnitte in einer pan-genotypischen NS5A-Polymerasen-Kettenreaktion zu vereinen (Abbildung 6).

NS5A wurde für die Amplifikation explizit ausgewählt, da NS5A-Hemmer als Standard in allen DAA-Kombinationstherapien eingesetzt werden. Bei nahezu allen Patienten mit Therapieversagen lassen sich RASs in NS5A nachweisen [62, 63]. Dies beherbergt jedoch zwei Probleme: zum einen werden spezifische Primer für die bisherigen Amplifikationsprotokolle der NS5A benötigt und zum anderen ist bisher unklar, ob eine zuverlässige Genotypisierung mit der NS5A Region möglich ist.

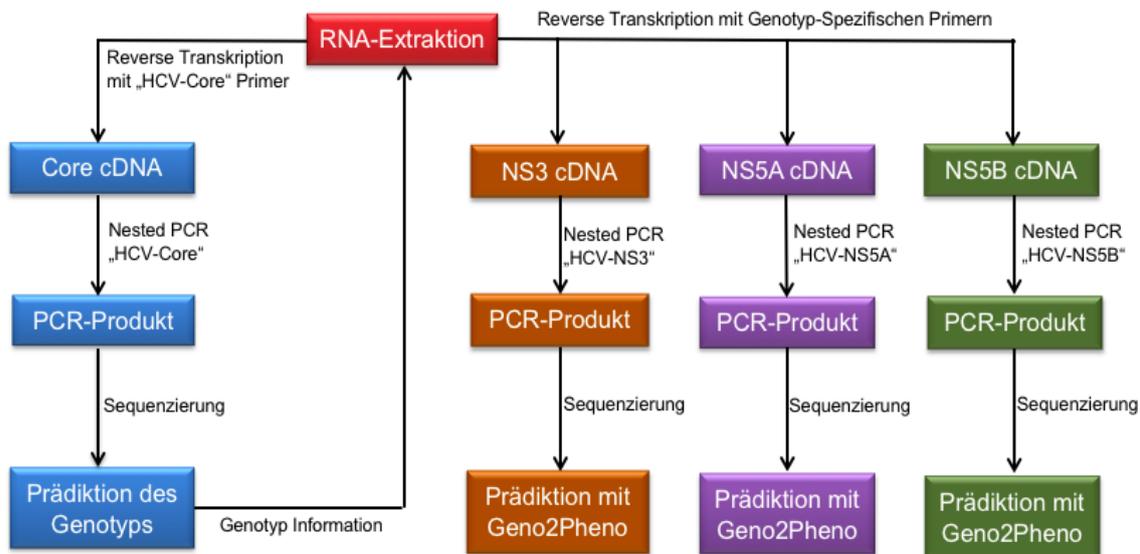


Abbildung 5: Übersicht der bisherigen Arbeitsschritte für die HCV-Genotypisierung in der Routinediagnostik an dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

Der Arbeitsablauf beginnt mit einer Bestimmung des Genotyps durch eine Sequenzierung der Core-Region. Durch die Kenntnis des Genotyps wird die Wahl von Genotyp-spezifischen Primer ermöglicht, mit welchen anschließend die Nicht-Struktur Proteine amplifiziert und sequenziert werden können. Dies ist Voraussetzung für die Prädiktion von Resistenzen mit $\text{Geno2Pheno}_{\text{HCV}}$ (siehe 3.3.11) modifiziert nach [61, 62].

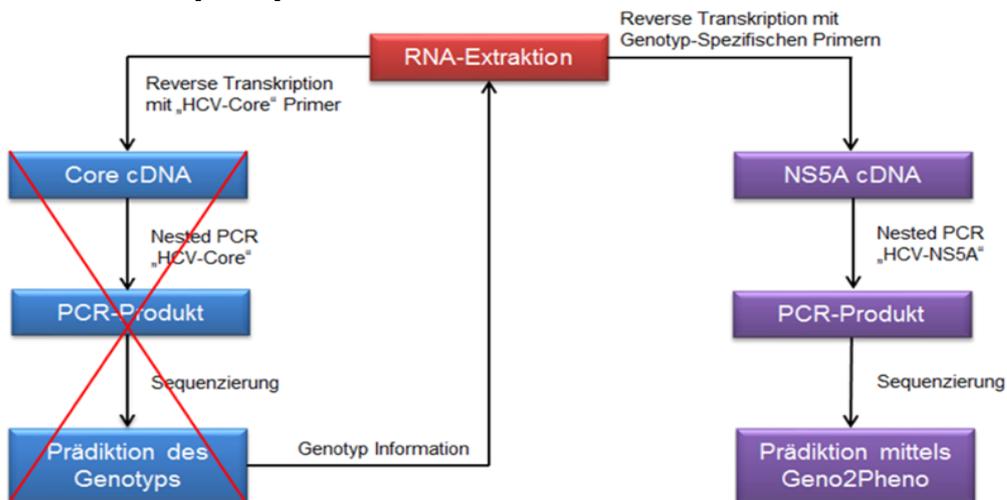


Abbildung 6: Übersicht der neu eingeführten Arbeitsschritte für eine pan-genotypische Amplifikation zur simultanen Genotypisierung und Resistenztestung der HCV-NS5A-Region an dem Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf

Basierend auf einem Genotyp-unabhängigen Voll-Genom-reversen-Transkriptions-Protokoll für die HCV-Genotypisierung und Resistenztestung, ist es möglich die Bearbeitung der Core-Region für die Prädiktion des Genotyps zu überspringen und direkt mit der Transkription der Nicht-Strukturproteine zu beginnen [62]

2 Ziele dieser Arbeit

Trotz Etablierung pan-genotypischer HCV-Therapieregime sind im europäischen Raum aktuell circa 14 Millionen Menschen chronisch an HCV erkrankt [4].

Die Dunkelziffer ist hier vermutlich doppelt so hoch [64].

Um die weiterhin steigenden Todeszahlen durch virale Hepatitiden zu reduzieren, ist es dringend erforderlich, Diagnostik- und Therapiemethoden zu verbessern [6] [32].

Die klinischen Auswirkungen von direkt wirkenden antiviralen Substanzen (DAA) auf Resistenz-assoziierte Substitutionen (RAS) und somit auf das Therapieansprechen von Hepatitis C Virus-Infektionen sind nach wie vor ungeklärt. Eine standardisierte Methode zum pan-genotypischen Nachweis von DAA-RASs in HCV wurden in der heutigen Diagnostik bisher nicht etabliert [65]. Üblicherweise wird aktuell zunächst eine Genotypisierung von HCV durchgeführt und anschließend eine genotyp-spezifische Untersuchung von therapie-relevanten genomischen Regionen im Virus vorgenommen.

Die Virussequenzierung besteht aus mehreren komplexen Schritten, einschließlich der Herstellung von Amplifikaten, der eigentlichen Sequenzierung und der Sequenzanalyse. Diese Schritte sind sehr zeitaufwändig und mit hohen Kosten verbunden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine schnelle und effiziente pan-genotypische Methode zur Amplifikation und Sequenzierung von NS5A zu etablieren, mit der eine kombinierte Genotypisierung sowie Resistenztestung von NS5A möglich ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

- 80°C Gefrierschrank	Ultra-Low Temperature Freezer, New Brunswick, Eppendorf, Deutschland
4 °C Kühlschrank	Bosch, Deutschland
Automatisierte Kapillarelektrophorese	QIAxcel Advanced, Qiagen, Deutschland
Automatisiertes Nukleinsäure-Reinigungssystem	EZ1 Advanced XL, Qiagen, Deutschland EZ1 Advanced Virus Card v2.0, Qiagen, Deutschland
Heizblöcke	Thermostat Plus, Eppendorf, Deutschland
Gel-Dokumentationsgerät	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland
Spannungsquelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Spektrophotometer	Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA, Sirs Lab, Deutschland
Sicherheitswerkbank	PCR-Chamber, Bära GmbH & Co. KG
Thermocycler	Mastercycler, Nexus, Eppendorf, Deutschland T3000, Biometra, Deutschland Professional Trio, Biometra, Deutschland / Analytik Jena, Deutschland
Vortexer	L46, Labinco Beheer B.V, Niederlande VV3, VWR, USA
Waage	Scout Pro Balance, Ohaus Corporation, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Deutschland Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Deutschland Color Sprout Mini-Zentrifuge, Biozym Scientific GmbH, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Desinfektionsmittel	Softa-man acute, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Elektrophoresekammern	Bode Sterilium, Bode Chemie Hamburg, Febikon Labortechnik GmbH, Deutschland
Gestell für Reaktionsgefäße	Greiner Cellstar 96 well plates, Greiner Bio-one, Deutschland neoLab-Top-Rack, Neolab Migge GmbH, 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
Pipetten	Eppendorf® Research® plus Pipette, Eppendorf, Deutschland
Präzisionstücher	Kimtech Science, Kimberly-Clark Professional Tapira Plus, Großverbrauchsspezialisten eG, Deutschland
Reagenzkartuschen	EZ1®, Virus Mini Kit v2.0, Qiagen, Deutschland
Reaktionsgefäße	SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Deutschland SafeSeal Reagiergefäß 2 ml Sarstedt, Deutschland QX 0,2 ml 12- Tube Strips, Qiagen, Deutschland PCR Tube Strips 0,2 ml, Eppendorf, Deutschland 15 ml Cellstar Polypropylen Röhrchen, Greiner, Deutschland

3.1.3 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

3.1.4 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

3.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden alle in einer Sequenz von 5' → 3' von der Firma Eurofins Scientific bezogen; sofern nicht anders beschrieben, wurden sie in einem Volumenverhältnis von 100 pmol/μl geliefert.

Tabelle 2: Übersicht der Oligonukleotide

Reaktion	Primer Name	Richtung	Sequenz 5' → 3'	Genotypen
RT	Oligo d(A)	Rückwärts	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1-7
PCR1	6069-F	Vorwärts	GAGGGGGCAGTGCAATGGATGA AYMGIYTIATIGCITYGC	1-7
	7542-R	Rückwärts	GAGATCCGGATCCCCAGGYTCIC CYTCIAGIGGIGGCATIGA	1,2,3,5,6,7
	7541-R	Rückwärts	AAGTCCGGGTCACCGGGGTCCC CYTCWARYGRAGGCWTTGA	4
PCR2	6105-F	Vorwärts	TTCGCCTCCCGGGGGAACCAAYG TITCICCIACICAYTAYGT	1,3-7
	6102-GT2-F	Vorwärts	GCCTTCGCCTCCCGGGGGAACC AYGTYGCCCCIACICAYTAYGT	2
	6852-R	Rückwärts	CACGGCTACGTCCGGTTCIGGIT CRCAIGGIAGYTGIGAYCC	1,3-7
	6854-GT2-R	Rückwärts	CAACACGGCTACGTCCGGTTCA GGITCRCARGGRAGYTGIGAICC	2
Sequenz	NS5A-Seq-F	Vorwärts	TTCGCCTCCCGGGGGAAC	na
	NS5A-Seq-R	Rückwärts	CACGGCTACGTCCGGTTC	na

3.1.6 verwendete Software

Geneious® 10.2.2	Biomatters Ltd. Neuseeland
Geno2Pheno _[HCV] version 3.4	GENAFOR - Gesellschaft für nachhaltige Forschung e.V., Deutschland (http://www.geno2pheno.org/)
Floureszenz- Dokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland
ChemoCam Imager	
Tree Of Life (iTOL) Version v3.6.1	European Molecular Biology Laboratory, Deutschland
QIAxcel® ScreenGel Software quick-start guide	Qiagen, Deutschland

3.2 Patienten

Im Rahmen der Studie „Die Bedeutung von Resistenzmutationen gegenüber Protease-Inhibitoren bei HCV-positiven Patienten“ kurz PEPSI, erfolgte zur Gewinnung von Plasma Blutentnahmen von HCV-infizierten Patienten.

Aus dem Plasma wird die Virus-RNA extrahiert, die für die weiteren Schritte benötigt wurde. Ziel der PEPSI-Studie ist es, mittels genotypischer Resistenztestung herauszufinden, welche Faktoren die Erbsubstanz der Hepatitis C-Viren beeinflussen und somit ein Therapieversagen (Resistenzen) auslösen. Alle Studienteilnehmer haben schriftlich in die Durchführung der Untersuchung eingewilligt.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer #2012048 geprüft und bewilligt.

3.3 Methode

3.3.1 Probenaufbereitung

Die Aufbereitung der Patientenproben erfolgt mittels eines Automaten für Nukleinsäureextraktionen aus freien Viren, mit dem Namen „EZ1 Advanced XL“ von Qiagen®. Die Nutzung des Gerätes setzt den Gebrauch einer „EZ1 Advanced Virus Card v2.0“, ebenfalls von Qiagen® voraus. Diese Karte ist mit Protokollen vorprogrammiert, welche einzelne Schritte der Aufreinigungsprozedur beinhalten und dem Benutzer während der Durchführung zur Verfügung steht, um die Handhabung des Gerätes zu vereinfachen. Das Prinzip beruht auf einer silikatbasierten Nukleinsäureextraktion kombiniert mit magnetischen Partikeln. Weitere Komponenten wie Lysepuffer, Waschpuffer und RNase-freie-Elutionspuffer, welche alle für die Aufreinigung benötigt werden, sind jeweils Bestandteil einzelner Reagenzkartuschen aus dem „EZ1 Virus Mini Kit v2.0“ von Qiagen®. Nach dem Protokoll des Herstellers werden Proteinkinasen A eingesetzt um virale Partikel aus Körperflüssigkeiten zu lysieren und RNAsen zu inaktivieren. Um eine höhere Ausbeute der RNA zu erzielen werden Träger-RNA's eingesetzt. Eine Träger-RNA beinhaltet circa 20-30 Thymin-Nukleinbasen, welche sich selbst an die Filtersäule binden und so die RNAsen t von dem Abbau der viralen RNA ablenken. Die Mindestprobenmenge liegt bei 200 µl, falls Proben ein geringeres Volumen aufweisen, besteht die Möglichkeit, diese mit Negativ-Plasma auf das Mindestvolumen aufzufüllen. Die Proben sollten nach Blutentnahme innerhalb von 24h verarbeitet werden.

Durch den EZ1 Advanced XL ist es möglich, virale Nukleinsäuren in verschiedenen Volumina zu extrahieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden in einem Volumen von 60 µl extrahiert und anschließend bei – 20°C eingelagert [62].

3.3.2 Reverse Transkription von HCV-RNA

Die Umschreibung von RNA in DNA erfolgt mittels reverser Transkriptase von Invitrogen mit dem Namen SuperScript™ III Reverse Transkriptase. Es handelt sich hierbei um eine konstruierte Version einer M-MLV reversen Transkriptase mit reduzierter RNase H-Aktivität und einer erhöhten thermischen Stabilität. Das Enzym kann zur Synthese von First-Strang-cDNA bei Temperaturen bis zu +55°C genutzt werden [66, 67]. Die reverse Transkription besteht aus zwei Schritten, hier genannt

„Mix 1“ und „RT-Reaktion“. Um die Arbeitszeit zu reduzieren, werden die Mischungen je nach Anzahl der durchzuführenden Proben angesetzt und die dazugehörigen Reagenzien entsprechend angepasst. „Mix 1“ setzt sich aus einem Gemisch von Oligo d(A) (50 pmol/μl), dNTP's (10 mM each) und nuklease-freiem Wasser zusammen. Zur Aufschmelzung von sekundären Strukturen wird nach Zugabe von 10 μl RNA-Eluat das Gemisch in einem Thermo-Cycler für 5 min bei 65°C erhitzt. Dieser Schritt wird RT-Step 1 genannt. Nach Abkühlung auf 25°C wird direkt im Anschluss ohne großen Zeitverlust 7 μl RT-Reaktion-Gemisch hinzugefügt. Die „RT-Reaktion“ setzt sich aus 5x first strand Buffer, 0,1 M DTT, RNase-Inhibitor und Superscript III Rt-Enzym zusammen. Anschließend erfolgt die reverse Transkription durch Inkubation für 10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C, 30 min bei 50°C und abschließend 30 min bei 55° in einem Thermocycler. Als letztes wird zur Denaturierung der RNA und der Superscript III nochmals für 15 min auf 75°C erhitzt. Es folgt eine Abkühlung auf 4°C, bei welcher die umschriebene cDNA stabil gehalten werden kann. Falls eine längere Aufbewahrung erforderlich sein sollte, wird die fertige Lösung bei -20°C tiefgefroren [62].

Tabelle 3: RT-Protokoll

Mix 1	RT-Step 1	RT-Reaktion	RT-Step-2-lang
1 μl d(a) (50pmol/ μl)	Insgesamt 13 μl	4 μl 5x first strand Buffer	Insgesamt 20 μl
1 μl dNTP's (10 mM each)	5 min bei 65°C	1 μl 0,1 M DTT	10 min bei 25°C
1 μl Wasser	2 min bei 25°C	1 μl RNase Inhibitor	60 min bei 42°C
10 μl RNA		1 μl Superscript™ III RT (200 U/ μl) 13 μl Mix 1	30 min bei 50°C
			30 min bei 55°C
			15 min bei 75°C
			Abkühlen auf 4°C

3.3.3 Nested PCR

Nach der reversen Transkription folgt die nested PCR (verschachtelte PCR). Hierbei handelt es sich um eine hochsensitive Zwei-Schritt-PCR, bei welcher die amplifizierten DNA-Abschnitte der ersten PCR als Ausgangsmaterial für den zweiten PCR-Durchgang genutzt werden. Die PCRs unterscheiden sich anhand der Primer und deren Bindekapazitäten auf Genomebene. Im ersten Schritt werden dazu Primer verwendet, welche an weiter außen gelegenen Bereichen der Nukleotidsequenz binden. Um die Sensitivität und die Spezifität zu erhöhen, werden für den zweiten Reaktionsschritt Primer verwendet, die sich an weiter innen gelegene Nukleotidsequenzen binden, wodurch die gezielte Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes aus einer geringeren Ausgangs-DNA ermöglicht wird [68].

Als Ausgangssubstanz für die PCR1 dienen pro Probe 5 µl der synthetisierten cDNA aus der reversen Transkriptase, welche in einen neuen Ansatz in 45 µl überführt werden. Unter der Nutzung des TaKaRa Ex Taq® Hotstart Version Polymerase Kits von Clontech Laboratories wird Folgendes hinzugefügt: 5 µl 10x Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) (20 mM), 4 µl dNTPs Mixture (2,5 mM each), 0,25 TaKaRa Ex Taq (5 U/µl), 28,25 µl Nuklease-freies Wasser. Für die Vorwärtsprimer werden 2,5 µl (10-50 pmol, final conc. 0.2-1.0 µM) und 2,5 µl (10-50 pmol final conc. 0.2-1.0 µM) jeweils für die Rückwärtsprimer verwendet (siehe 3.1.5). Falls weitere Primer kombiniert wurden, reduzierte man das Volumen des Wassers.

Für PCR2 dienen pro Probe 3 µl PCR1-Produkt als Ausgangsmaterial. Die Reagenzien für den zweiten PCR-Schritt sind mit dem der PCR1 bis auf das Volumen und die verwendeten Primer: 25,75 µl Nuklease freies Wasser und 2,5 µl (10-50 pmol, final conc. 0.2-1.0 µM) jeweils für die Vorwärtsprimer identisch. Dieses gilt auch für die Rückwärtsprimer (siehe 3.1.5)

Die Nested-PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Tabelle 4: Nested-PCR-Protokoll

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus	Funktion
94.0°	05:00 min	1x	DNA-Denaturierung Polymerase Aktivierung
95.0°	00:30 min		Aufschmelzen der DNA
55.0°	00:30 min	35-45 x	Primer Hybridisierung
72.0°	02:00 min		Verlängerung
72.0°	10:00 min	1x	Finale Verlängerung
10.0°	Pause	-	Lagerung

3.3.4 QIAxcel® Advanced System

Das QIAxcel® Advanced System von Qiagen ist ein Gerät, welches automatisierte Kapillarelektrophoresen durchführt. Eine Kapillarelektrophorese ist ein analytisches Trennverfahren, das auf dem Prinzip einer Elektrophorese basiert. Die zu analysierenden Proben werden mit jeweils 10 µl in die vorgesehenen Streifen QX 0,2ml 12-Tube-Strips von Qiagen überführt. Tubes, die in einem 12er-Streifen nicht befüllt worden sind, müssen mit 10 µl QX DNA Dilution-Buffer von Qiagen gefüllt werden. Die Elektrophorese findet in dünnen alleinstehenden und mit Puffer gefüllten Glaskapillaren statt. Die einzelnen Glaskapillaren befinden sich gesammelt in einer Patrone („Cartridge“) im System. Nach Injektion der zu untersuchenden Proben in die Kapillaren, wird die Patrone eine elektrolythaltige Lösung getaucht. Durch Anlage einer elektrischen Spannung wandern die DNA-Fragmente von der Kathode aus in Richtung Anode und werden so aufgeteilt. Durch Leuchtdioden und mikrooptische Kollektoren, werden die DNA-Fragmente detektiert und mit einer Software dargestellt. Die Software zeigt die Ergebnisse als Elektropherogramm oder auch im Gelbildformat zusammen mit den Basenpaargrößen der DNA-Fragmente an.

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, die es ermöglicht, Nukleinsäuren in PCR-Produkten ihrer Größe nach durch elektronische Spannung aufzutrennen. Um ein Agarosegel herzustellen, werden 0,4g Agarosepulver in 50 ml 1x TBE-Puffer unter Erhitzung für eine Minute in der Mikrowelle aufgelöst bis eine klare Lösung vorhanden ist. Anschließend werden der Lösung 4 Tropfen 0,025 µl/ml Ethidiumbromid beigefügt, das Gemisch wird ein zweites Mal für 30 Sekunden erhitzt. Das erhitzte Gel wird in eine Gelelektrophoresenwanne gegossen. Um ein gleichmäßig verteiltes Gel und Geltaschen zu erhalten, wird dieses in einer 20-minütigen Aushärtungsphase bei Raumtemperatur mit Kämmen in der Wanne fixiert. Das erstarrte Gel wird anschließend mit 1x TBE-Puffer vollständig begossen. Durch das Entfernen der Kämmen entstehen Geltaschen, in welche die DNA-Proben hinein pipettiert werden. In die erste äußere Geltasche werden 2 µl Größenmarker „Gene Ruler 1 KB ladder“ oder „Gene Ruler DNA ladder Mix“ (siehe 3.1.2) pipettiert. Anschließend werden die restlichen Geltaschen mit 10 µl PCR2-Produkt gefüllt, welche zuvor jedoch mit *green 6x loading Dye* vermischt wurden. Anschließend wird die DNA bei 70 mA für 50 Minuten aufgetrennt und die DNA mittels UV-Strahlung in einer Gel-Dokumentationskammer (Intas Science Imaging Instruments GmbH) sichtbar gemacht. Mittels der Software „Floureszenz-Dokumentationssystem ChemoCam Imager“, ebenfalls von Intas Science Imaging Instruments GmbH, lassen sich die Ergebnisse bildlich darstellen. Um das Ausmaß der DNA-Banden zu beurteilen, wird der entsprechend eingesetzte Größenmarker mit herangezogen.

3.3.6 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von erfolgreich amplifizierten PCR-Produkten erfolgt mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (250) von Qiagen. Das Reinigungsverfahren basiert auf einer Siliciumdioxid-Membran-Technologie umgesetzt in einem Binde-Wasch-Eluat-Verfahren. Zu Beginn des Aufreinigungsprozesses wird eine Filtersäule in ein Auffangreagenz gesetzt, in welche anschließend 450 µl Bindungspuffer PB hinein pipettiert werden. Das komplette PCR 2-Produkt von 45 µl wird mit hineingemischt. Das Gemisch wird für 30 Sekunden bei 13.000 rpm in der Zentrifuge 5415 D von Eppendorf zentrifugiert, was dazu führt, dass das Gemisch den Filter passiert und die DNA an den Filter bindet. Der Durchfluss im Auffangreagenz wird verworfen. Die Filtersäule wird mit 750 µl Waschpuffer PE gewaschen. Das Reagenz wird für eine

Minute bei Raumtemperatur zur Inkubation stehen gelassen, damit der alkoholhaltige Waschpuffer die am Filter gebundene DNA reinigen kann. Anschließend wird ein zweites Mal für 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen. Um überschüssige Ethanolreste zu entfernen, wird ein zweites Mal für eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird danach in ein frisches und beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Direkt auf die Säule werden 30 µl Elutionspuffer EB pipettiert, und es folgt eine weitere Minute Inkubationszeit. Nach einer Minute langem Zentrifugieren bei 13.000 rpm wird die Filtersäule verworfen. Die aufgereinigte DNA befindet sich gesammelt im Reaktionsgefäß und ist damit fertig bearbeitet für die Sequenzierung. Die jeweiligen Puffer sind Bestandteile des verwendeten Kits (siehe 3.1.4)

3.3.7 Enzymatische DNA-Aufreinigung

Eine Alternative zur unter 3.3.6. aufgeführten DNA-Aufreinigung ist die enzymatische Aufreinigung von amplifizierten PCR-Produkten mit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent von Thermo Fisher Scientific. Der Reaktionsaufbau besteht aus einer einmaligen Pipettierung, gefolgt von zwei Inkubationen. Ein Gesamtvolumen von 7 µl bestehend aus 5 µl PCR Produkt und 2 µl ExoSAP-IT™ werden im ersten Inkubationsdurchgang für 15 min bei 37°C erwärmt. Dieser Schritt dient dem Abbau von überschüssigem Primer und dephosphorylierten Nukleotiden. Anschließend folgt in der zweiten Inkubation über erneute 15 min bei 80°C eine Inaktivierung der Enzyme. Nach dem Inkubieren sind die Proben fertig aufgereinigt für nachgeschaltete Sequenzierungen.

3.3.8 Konzentrationsmessung

Um die Konzentration der aufgereinigten DNA zu messen, wird der Spektrophotometer NanoDrop 2000 von Thermo Scientific™ verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Vollspektrum-UV-Spektrophotometer, welches die DNA-Reinheit in 1-2 µl Proben beurteilen kann. Das messbare Lichtspektrum, welches sich auch graphisch darstellen lässt, liegt zwischen 190-840 nm. Die Messung erfolgt aus zwei Lichtquellen: einer als Lichtquelle dienenden Xenonlampe und einem Spektrometer mit einem CCD-Sensor, welcher das durch die Probe durchtretende Licht analysiert. Unterstützt wird der Spektrophotometer mit einer Computer-Software [69].

3.3.9 Sequenzierung

Das Sequenzierungsverfahren der PCR-Produkte basiert auf der Didesoxymethode nach Sanger und wird von einer Firma [LGC Genomics GmbH in Berlin Deutschland bzw. Eurofins] ausgeführt. Es werden 48 nicht aufgereinigte PCR-2-Proben in einer 96-well-Platte zusammen mit zwei Sequenzierungsprimer Seq-F und Seq-R eingeschickt (siehe 3.1.5). Der Sequenzieransatz setzt sich zusammen aus 2,0 µl pro Primer [10µM] für eine >300 ng Probe und wird mit Wasser auf 17 µl aufgefüllt.

3.3.10 Sequenzanalyse

Die Sequenz- und Chromatogrammanalyse, sowie die Herstellung von Konsensus Sequenzen oder phylogenetischen Bäumen wird durch die Nutzung der Software „Geneious® 10.2.2“ von Biomatters Ltd. aus Neuseeland ermöglicht.

3.3.11 Geno2Pheno_[HCV]

Mittels eines online-basierten Interpretationssystems Namens Geno2Pheno_[HCV] von GENAFOR (Gesellschaft für nachhaltige Forschung e.V.) Deutschland (<http://www.geno2pheno.org/>), wird die Ermittlung der Therapie basierend auf DAA-Behandlungsstrategien von HCV unterstützt. Die Software identifiziert mittels Sequenzdaten die genomischen Regionen, generiert Prognosen für die jeweiligen HCV-Geno- und Subtypen und erstellt für jede DAA einen Arzneimittelresistenz-Vorhersagebericht [70].

3.3.12 Interactive Tree Of Life (iTOL)

Das online verfügbare Bearbeitungsprogramm „Interactive Tree Of Life (iTOL)“ von EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Deutschland (<https://itol.embl.de/>), ermöglicht die graphische Darstellung und Bearbeitung von phylogenetischen Bäumen. Mit der Software lassen sich einzelne Zweige interaktiv beschneiden, drehen und farblich markieren [71].

4 Ergebnisse

4.1 Primer-Design für eine pan-genotypische PCR

Um eine Amplifikationsstrategie zu entwickeln, die eine Genotypisierung und gleichzeitige Identifikation von Resistenz-assoziierten Varianten in NS5A ermöglicht, wurden konservierte Primer-Bindungsregionen in NS4B und NS5A gesucht. Dafür wurden 488 HCV Referenz Sequenzen aus der Los Alamos Sequenz Datenbank [72] analysiert. Hierbei wurden die Nukleotid-Regionen 6069-6146, 6810-6851 und 7500-7541 identifiziert, welche zwischen allen Genotypen hochkonserviert waren.

Aus früheren Arbeiten [73, 74] war bekannt, dass längere Primer, welche aus einer variablen 3'-Region mit degenerierten Nukleotiden bestehen, gefolgt von einem konservierten Abschnitt ohne degenerierte Nukleotide, ein besseres Bindungsprofil aufweisen als kürzere Primer.

Aus diesem Grund wurden die aufgeführten Primer (siehe 3.1.5, Tabelle 2) mit einem konservierten 5'-Bereich und einer pan-genotypischen variablen 3'-Region mit bis zu 8 degenerierten Basen hergestellt.

Um die Bindungswahrscheinlichkeiten und um direkt eine erfolgreiche Sequenzierung des Amplikons zu gewährleisten, bestand der konservierte 5'-Bereich aus konservierten Nukleotiden. Diese wurden von Genotyp 1a abgeleitet.

Um auch niedrig virämische Proben amplifizieren zu können, wurden neun Primer für eine nested-PCR (siehe Methoden Abschnitt 3.3.3) hergestellt.

Für den ersten PCR-Schritt wurden die Primer 6069-F, 7542-R-WO4 und 7541-R-GT4 entworfen. Der zweite PCR-Schritt beinhaltet die Primer 6105-F und 6852-R. Die Bindung der Primer im HCV-Genom sowie der Aufbau der nested-PCR ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

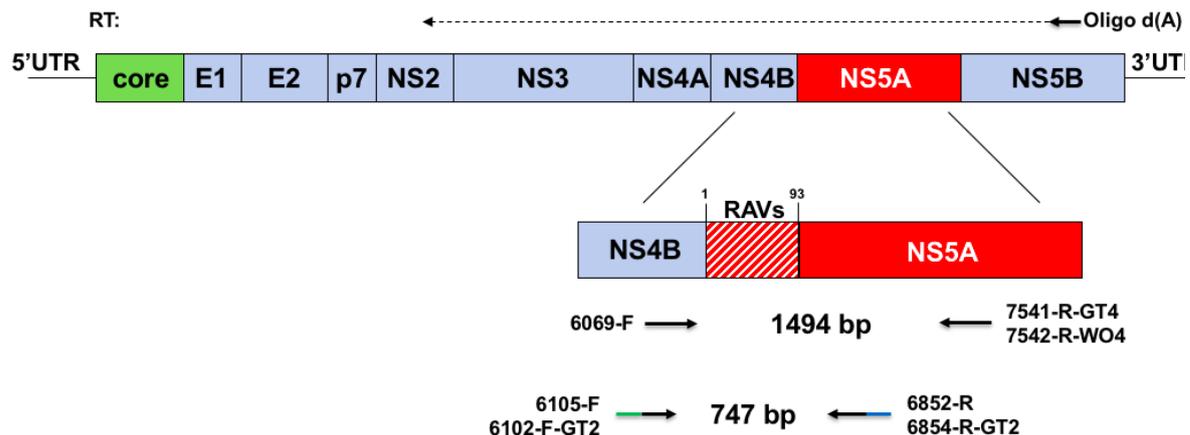


Abbildung 7: Übersicht des pan-genotypischen NS5A Ansatzes

Zu sehen ist das Schemata des HCV-Genoms auf Basis des H77-Referenzgenoms zur Verdeutlichung des zu etablierenden pan-genotypischen NS5A-PCR-Protokolls. Zentral ist das HCV-Genom dargestellt. Darüber ist der Primer (Oligo d(A)) für die Reverse Transkriptase und unterhalb ist die Übersicht der nested-PCR Primer für die Genotypisierung und Resistenztestung zu sehen. Der horizontal gestreifte Abschnitt ist der Bereich, in dem die RASs in der NS5A-Region zu finden sind. Zur Verbesserung der Bindung und direkten Sequenzierung des Amplikons wurden alle Primer mit einem Variablen-3'-Teil mit bis zu 8 degenerierten oder Inosin-Basen gefolgt von 18–23 Nukleotiden aus Genotyp 1a entworfen. Die Amplikons werden direkt als Primer Seq-F und Seq-R (dargestellt als grüner und blauer Streifen auf dem PCR-2 Primer) sequenziert, die in den pan-genotypischen Primer an die Genotyp 1a-Sequenz gebunden sind. Modifiziert nach [1].

4.2 Amplifikation von NS5A mittels GoTaq Polymerase

Um zu untersuchen ob sich mit den im vorherigen Abschnitt hergestellten Primer, in einer nested-PCR (siehe 3.3.3), die NS5A Region amplifizieren lässt, wurde eine hochvirämische Probe mit den Primer 6069-F, 7542-R-WO4, 7541-R-GT4, 6105-F, 6852-R und der GoTaq® DNA Polymerase von Promega amplifiziert.

Ziel dieses Versuches war es, die Effizienz der einzelnen Primer zu testen. Hierzu wurde die HCV-RNA aus einem Genotyp 1a infizierten Patienten mit dem Primer Oligo d(A) (siehe 3.3.2) in cDNA transkribiert. Die Umschreibung von RNA in DNA erfolgt mittels reverser Transkriptase von Invitrogen und ist unter 3.3.2 explizit aufgeführt.

Die Amplifikation im ersten PCR-Schritt erfolgte mit dem Primer-Design 6069-F, 7542-R-WO4 und 7541-R-GT4. Anschließend wurde das PCR1-Produkt im zweiten PCR-Schritt mit den Primer 6105-F und 6852-R amplifiziert.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen, ließen sich mit dieser Primer-Kombination und der GoTaq-Polymerase keine spezifischen Banden mit korrekter Fragmentlänge amplifizieren.

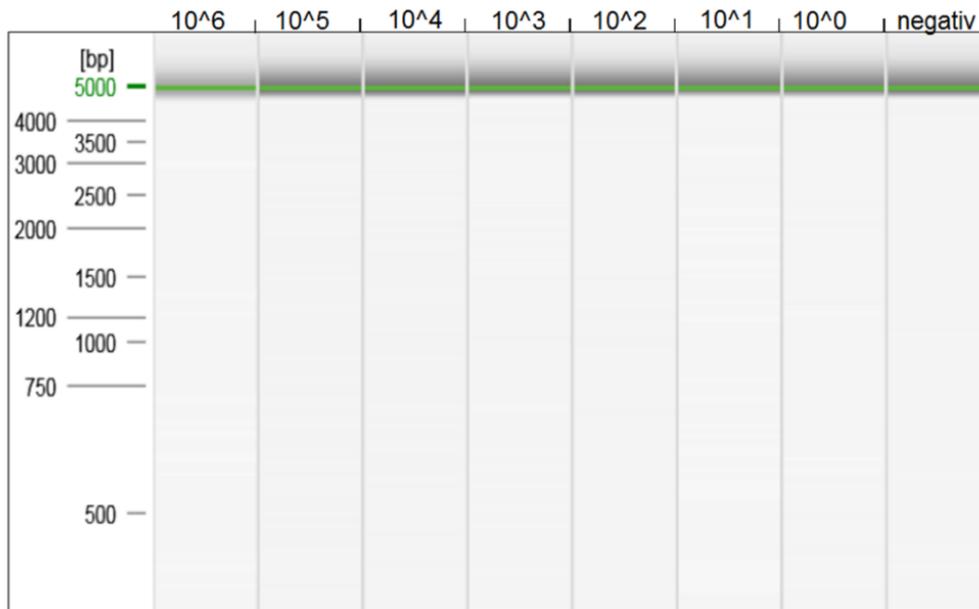


Abbildung 8: Erster Amplifikationsversuch der NS5A-Region mittels nested-PCR fehlgeschlagen

Zu sehen ist die Auswertung einer Kapillarelektrophorese zur Darstellung des Amplikon aus der NS5A-Region. Es wurde eine Titrationsreihe einer hoch virämischen cDNA einer Patientenprobe angefertigt, und mittels nested-PCR amplifiziert (siehe 3.3.3). Die Primer-Kombination setzt sich für PCR1 aus 6069-F + 7541-R-WO4 und 7541-R-GT4 zusammen. Die Kombination für PCR2 besteht aus den Primer 6105-F und 6852-R. Die PCR-Produkte wurden über eine Qiaxcel®-Kapillarelektrophorese aufgetrennt (3.3.4). Das erwartete PCR-Produkt sollte eine Größe von 747 Basenpaaren haben.

4.3 Testung von Genotyp 1a Primer in Kombination mit universellen NS5A Primer

Nachdem eine Amplifikation von NS5A mit der pan-genotypischen Primer-Kombination unter Verwendung der GoTaq Polymerase nicht funktionierte, stellte sich die Frage nach der Ursache.

Um zu untersuchen, welcher der neu entwickelten Primer nicht funktionierte, wurde in einem funktionierenden NS5A-Protokoll aus der Routinediagnostik jeweils ein Genotyp 1a-Primer durch einen universellen Primer ersetzt und anschließend die Funktionsfähigkeit der PCR überprüft.

Die Primer-Kombinationen sind in Tabelle 5 angegeben.

Zur Vereinfachung sind sie nach dem jeweils untersuchten Primer benannt.

Tabelle 5: Übersicht der Primer-Kombination

	PCR 1	Fragmentlänge	PCR 2	Fragmentlänge
Positiv Kontrolle	5cF + 5eR	931 Bp	5dF + 5dR	428 Bp
6069 - F Kontrolle	6069F + 5eR	809 Bp	5dF + 5dR	428 Bp
6105 - F Kontrolle	5cF + 5eR	931 Bp	6105F + 5dR	605 Bp
6852 - R Kontrolle	5cF + 5eR	931 Bp	5dF + 6852R	570 Bp
7542 - F - WO4 Kontrolle	7542-F-WO4	1595 Bp	5dF + 5dR	428 Bp

Um einen direkten Vergleich zu erzielen, erfolgte die Transkription von zwei HCV-Infizierten Patientenproben A (VI: 15194, VL: 21.357.136, Genotyp 1a) und B (VI: 5568, VL: 6.035.702, Genotyp 1a) in cDNA mittels Reverse Transkriptase. Anschließend erfolgte die mit den in Tabelle 5 aufgelisteten Primer-Kombination eine Vervielfältigung mit der GoTaq® DNA Polymerase von Promega.

In dem Versuch erfolgte die simultane Gegentestung der Primer-Kombinationen mit Negativkontrollen. In der Kapillarelektrophorese konnten aus der NS5A-Region, je

nach der individuellen Fragmentlänge von 428 Bp bis 1595 Bp der Kontroll-Primer, positive Banden amplifiziert werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Amplifikation von NS5A mit den universellen Primer in Kombination mit dem Genotyp-spezifischen Primer möglich ist.

Es gilt zu beachten, dass aufgrund der hohen Viruslasten der Proben es sich auch um ein falsch-positives Ergebnis handeln könnte und die universellen Primer nicht funktionsfähig sind.

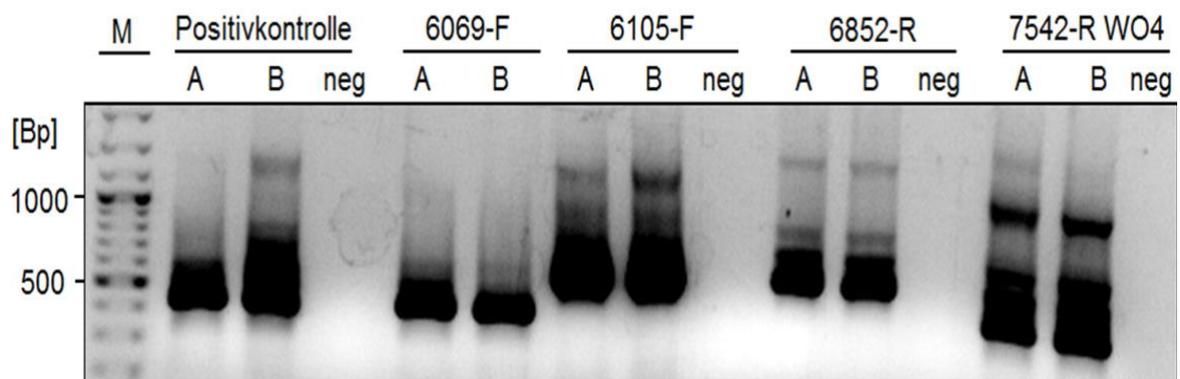


Abbildung 9: Testung der neu designten Primer in Kombination mit dem etablierten HCV-Universalprimer

Zu sehen ist die Auswertung der Gelelektrophorese zur Darstellung der amplifizierten Bereiche von Primer-Kombinationen aus Genotyp 1a und universellen Primer für den NS5A-Abschnitt. Es wurden fünf Primer-Kombinationen, bestehend aus universellen Primer und Genotyp 1a-Primer analysiert. Ziel dieses Versuches war es, die Effizienz der Genotyp 1a-Primer zu testen. Die jeweiligen Kombinationen wurden mittels nested-PCR vervielfältigt (siehe 3.3.3). Die Primer-Kombinationen wiesen für die Patientenprobe 15194, hier A, und für die Patientenprobe 5568, hier B, jeweils positive Banden auf. Sie dienen als Nachweis für eine erfolgreiche Amplifikation der Region NS5A. Die Fragmentgrößen, sowie die Primer-Kombinationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Da es sich bei der Positivkontrolle und der 6069-F Kontrolle um dieselbe PCR 2-Kombination handelt, wurde hier nur eine Negativkontrolle aufgeführt.

Nachdem die Primer-Kombinationsversuche mit den Genotyp-spezifischen Primer nicht die gehoffte Aussagekraft hatten und in der Abbildung 9 auch größere Banden sichtbar waren, die der PCR1 entsprechen könnten, wurde nun zusätzlich noch die PCR1-Reaktion über ein Agarosegel aufgetrennt.

Wie in Abbildung 10 zu ersehen, ist tatsächlich bei der Positiv-Kontrolle sowie bei 7542-R WO4 bereits nach einer PCR eine Bande der erwarteten Größe sichtbar. Dies ist bei hohen Viruslasten zu erwarten. Auch bei 6069-F ist eine schwache Bande der korrekten Größe sichtbar, so dass geschlossen wurde, dass die PCR1 Primer funktionell sind.

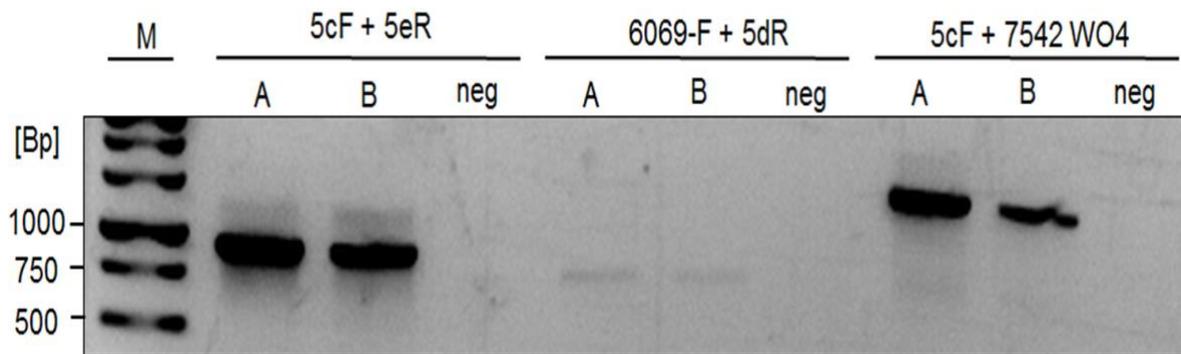


Abbildung 10: Testung der Funktionsfähigkeit der etablierten Primer durch die Amplifikation von PCR1

Zu sehen ist die Darstellung eines amplifizierten PCR1-Schrittes bestehend aus der Kombination von Genotyp 1a und universal Primer. Die Durchführung der ersten nested-PCR Schritte erfolgte wie in Abbildung 9 und unter 3.3.3 beschrieben. Die Fragmentgrößen, sowie die Primer-Kombinationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Gelelektrophorese weist Banden für die Positivkontrolle bestehend aus 5cF + 5eR mit einer Fragmentlänge von 931 Bp auf, so wie 1595 Bp für die PCR1 der 7542-R WO4 Kontrolle mit den Primer 5cF + 7542-R WO4. Die PCR 1 Kombination 6069-F + 5dR weisen sehr schwache Banden auf.

4.4 Amplifikation mit Primer 6852-R

Da die PCR Primer-Kombinationen mit Genotyp 1a-Primern für den ersten PCR-Schritt funktionsfähig waren, stellte sich die Frage, in wie weit sich die Effektivität der PCR verändert, wenn an Stelle von Genotyp 1a Primer die universellen Primer 6069-F und 7542-R WO4 verwendet werden.

Daraufhin hin wurde die PCR mit Kombinationen aus universellen Primer und Genotyp-spezifischen, sowie mit nur universellen Primer amplifiziert. Wie in Abbildung 11 zu sehen, war es möglich, das gewünschte Fragment von 605bp mit den Kombinationen 5dF + 5dR und 6105-F + 5dR zu amplifizieren.

Die Primer-Kombinationen 5dF + 6852-R und 6105-F und 6852-R ergaben jeweils keine Banden. Somit liegt es nahe, dass der Universal-Primer 6852-R nicht richtig funktionierte. Gründe hierfür könnten auf der Sequenzebene des Primer selbst liegen oder an der Funktionalität der bisher verwendeten GoTaq® DNA Polymerase, sodass diese beiden Annahmen überprüft wurden.

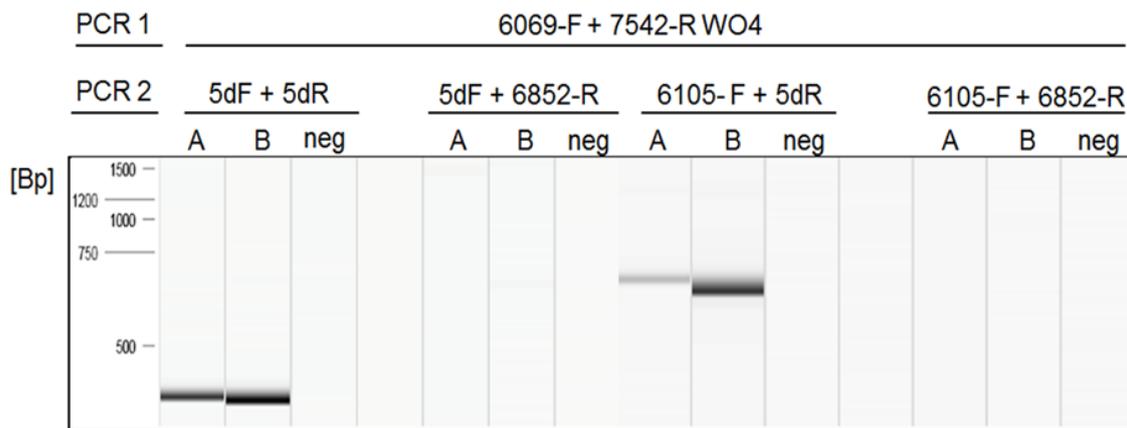


Abbildung 11: Testung der Funktionsfähigkeit von universellen Primerkombinationen

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Funktionalität einer Genotyp 1a und universellen Primerkombination. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie in Abbildung 9 und wie unter 3.3.3 beschrieben. Die Fragmentgrößen, sowie die Primer-Kombinationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Kapillarelektrophorese weist für die Patientenproben A und B der ersten Kombination mit der PCR2 der Positivkontrolle einem PCR-Produkt mit 428 Bp an. Die Primer-Paare 5dF + 6852-R amplifizieren DNA-Fragmente mit einer Länge von 605 Bp, wobei A geringer vervielfältigt wurde als B. Die Kombination 5dF + 6852-R, sowie der Mix aus dem Universal-Primer 6105-F + 6852-R amplifizierte kein PCR-Produkt. Erwartet wurden hier Produkte mit 570 Bp und 747 Bp.

4.5 Direkter Einsatz von cDNA als Template für die Amplifikation mit Hilfe von Genotyp 1a

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PCR mit dem Universal-Primer 6852-R inadäquat funktionierte, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen.

Die cDNA der Patienten A und B wurden mittels Genotyp-spezifischer PCR1 (5cF + 5eR) vervielfältigt. Die weiterführende Amplifikation im zweiten PCR-Schritt beinhaltete die universellen Primer 6105-F und 6852-R. Als Positiv-Kontrolle diente die PCR2 mit den Primer 5dF + 5dR. Das Ergebnis sollte sich für die Primer-Kombination 6105-F und 6852-R mit einem PCR-Produkt von 747 Bp widerspiegeln. Das Amplifikat der Kapillarelektrophorese (Abbildung 12) entspricht jedoch nicht der gewünschten Bandenintensität und ist kaum zu erkennen, sodass anzunehmen war, dass die Amplifikation dieser Primer-Konstellation nicht effizient genug ist.

Das Versuchsergebnis der Amplifikation der Positivkontrolle lag in dem erwarteten Bereich mit einer DNA-Fragmentlänge von 428 Bp und hat somit funktioniert.

In dieser Testung konnte nachgewiesen werden, dass der Primer 6852-R nicht einwandfrei funktioniert und demnach ausgetauscht werden muss.

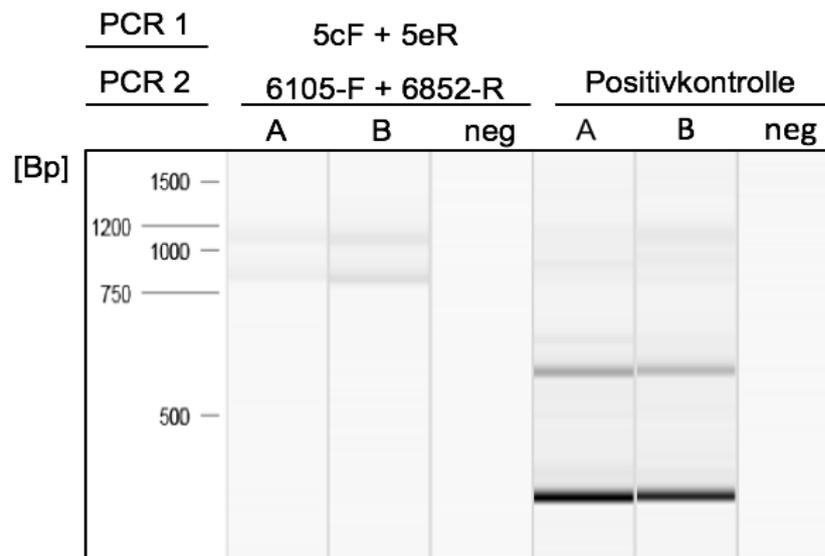


Abbildung 12: Testung zur Funktionalität des universal Primers durch Amplifikation von Genotyp 1a mit cDNA als Template

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Amplifikation von Genotyp 1a mit cDNA als Template unter Verwendung der universellen Primer 6105-F und 6852-R. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie in Abbildung 9 und wie unter 3.3.3 beschrieben. Die QIAxcel®-Kapillarelektrophorese weist für die Positivkontrolle und die cDNA-Primer-Kombination unspezifische Banden auf. Eine Vervielfältigung des PCR-Produktes in Kombination der Primer 6105-F + 6852-R für PCR2 war nicht erfolgreich.

4.6 Testung verschiedener Polymerasen zur Protokolloptimierung

Generell wurden die für die PCR verwendeten Primer an degenerierten Primer-Positionen mit der Base Inosin ausgestattet, um die Bindekapazität zwischen den einzelnen Nukleotidbasen (A, G und T) und somit die gesamte Zuverlässigkeit und Effektivität einer PCR zu verbessern. Inosinhaltige Primer werden jedoch nicht von allen Polymerasen gleichermaßen akzeptiert [75].

Um zu untersuchen, ob die geringe Amplifikationseffizienz, bedingt durch den reverse Primer 6852-R, mittels Verwendung einer anderen Polymerase ausgeglichen werden konnte, wurden im weiteren Verlauf weitere Polymerasen getestet. Hierzu wurden drei verschiedene Polymerasen; TaKaRa Ex Taq Hotstart Version (TaKaRa), HotstarTaq Plus PCR DNA Polymerase (Qiagen) und Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) mit einer identischen Primer-Kombination getestet und miteinander verglichen.

Wie der Abbildung 13 zu entnehmen, waren alle Polymerasen in der Lage, das erwartete Fragment der Positivkontrolle zu amplifizieren. Im Gegensatz dazu war nur die TaKaRa-Polymerase in der Lage, die erwarteten Fragmente von einer Größe von 428 Bp, 570 Bp, 605 Bp und 747 Bp effizient zu amplifizieren. Die Platinum Taq

Polymerase von Invitrogen war zwar auch in der Lage, die zu erwartenden Fragmente zu amplifizieren, die Intensität der Banden war jedoch deutlich geringer, was auf eine geringere Amplifikationseffizienz schließen lässt.

Wie die GoTaq® DNA-Polymerase (siehe Abbildung 9) war die Qiagen HotStar-Polymerase ebenfalls nicht in der Lage, die pan-genotypische Kombination zu amplifizieren.

Da die TaKaRa-Polymerase im Vergleich zu den anderen Polymerasen die Primer-Kombinationen am besten vervielfältigt hat und zudem den Vorteil einer „Korrekturlese-Funktion“ in Form einer 3' → 5' Exonuklease besitzt, wurde diese Polymerase für alle weiteren Versuche an Stelle der GoTaq® DNA-Polymerase verwendet [76].

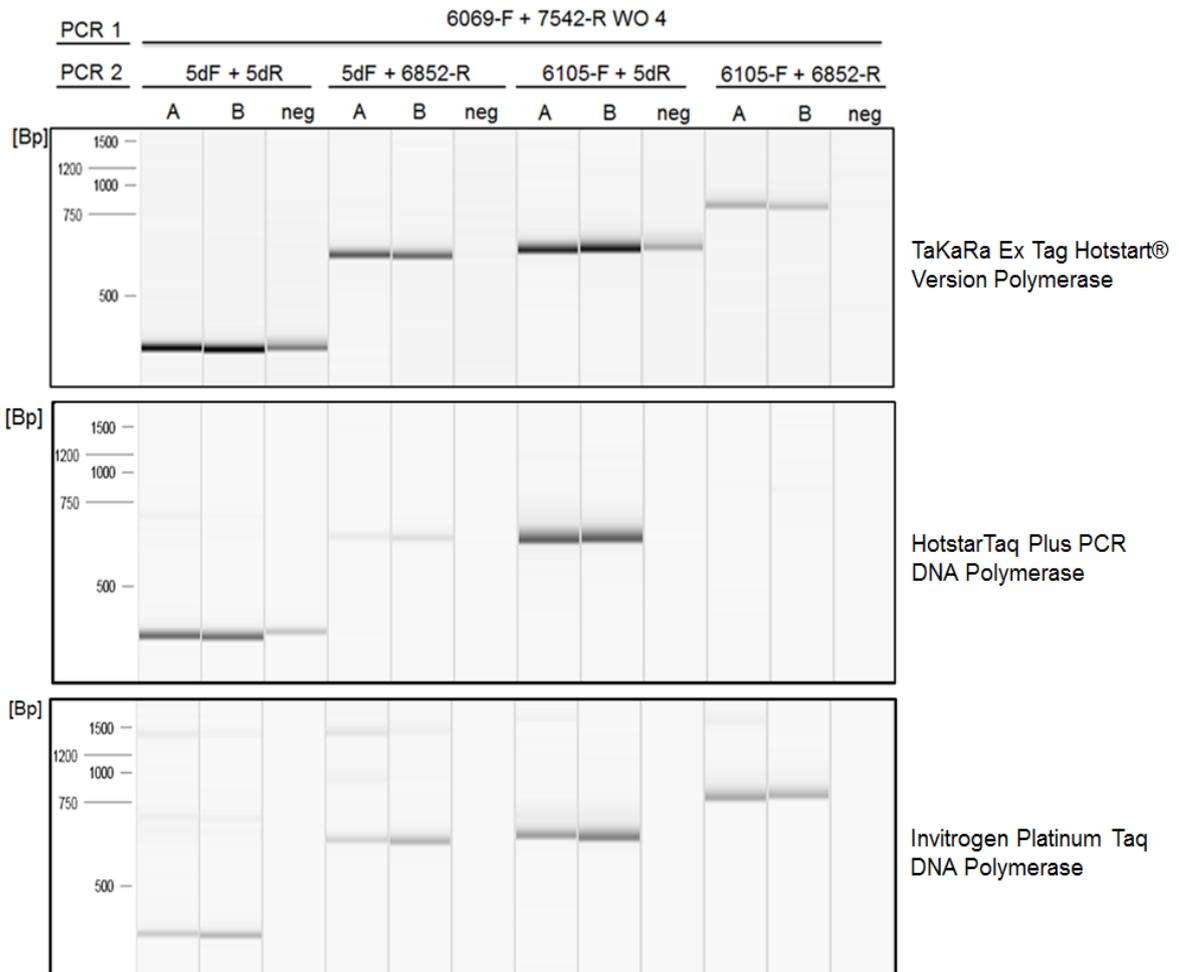


Abbildung 13: Testung verschiedener Polymerasen zur optimierten Amplifikation des PCR-Produkts

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Abbildung 9 und wie unter 3.3.3 beschrieben. PCR1 in der TaKaRa Ex Taq Hotstart® Version Polymerase wurde 1:1000 verdünnt und als Template für PCR2 eingesetzt. Für Kombination 1 zeigte die Kapillarelektrophorese ein PCR-Produkt von 428 Bp. Kombination 2 zeigte eine Vervielfältigung von 570 Bp auf. Für Kombination 3 wurde ein Produkt mit einer DNA-Fragmentlänge von 605 Bp amplifiziert. Die Banden in der Negativkontrolle wurde als Verunreinigung im Rahmen der Ausführung gewertet. Die 4. Kombination wies Banden auf Höhe von 747 Bp auf. In absteigender Reihenfolge der Funktionalität lies sich die Wirkungsweise der einzelnen Polymerasen erkennen, wobei die TaKaRa Ex Taq Hotstart Version Polymerase die höchste Bandenintensität aufwies. Die HotstarTaq Plus PCR DNA Polymerase amplifizierte für Kombination 2 unspezifische Banden und für Kombination 4 kein PCR-Produkt. Die Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase wies in allen vier Kombinationen Banden mit geringerer Intensität auf.

4.7 Testung des optimierten Reverseprimer 6852-R

Da der Primer 6852-R in den vorangegangenen Experimenten nicht effizient genug war, wurde mit der Sequenzanalyse-Software Geneious® 10.2.2 der Primer überarbeitet. Gemäß der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) wurde nach dem *Ambiguity Code* (siehe Tabelle 6) durch das Austauschen von Nukleosidbasen die Sequenz-Variationen und die Variabilität in dem hier vorliegenden Primer reduziert [77]. Im Primer selbst wurden zwei Nukleotide „Inosin“ gegen zwei „Ambiguities“ (Y) ausgetauscht, damit besitzt er nun fünf „spacer“ und nur noch drei Ambiguities.

Tabelle 6: Ambiguity Code

N	A, C, G oder T
R	A oder G (Purin-Basen)
Y	C oder T (Pyrimidin-Basen)
modifiziert nach [77]	

Um die Verbesserung der Funktionalität des neu entwickelten Primers zu testen, wurden zwei verschiedene Primer-Kombinationen mit der TaKaRa Ex Taq Hotstart Version Polymerase vervielfältigt. Zuerst wurde PCR1 mit Genotyp-spezifischen Primern (5cF + 5eR) amplifiziert und in verschiedenen Zusammensetzungen für PCR2 mit den Genotyp 1a Primer 5dF und 5dR, sowie mit dem Universal-Primer 6105-F und dem neuen sequenzanalysierten Universal-Primer 6852-R getestet.

Das Testergebnis ist in Abbildung 14 A aufgeführt.

Alle vier Primer-Kombinationen waren in der Lage, NS5A zu amplifizieren. Die erkennbaren Basenpaargrößen entsprechen den korrekten DNA-Fragmentlängen. Da in der ersten Experimentkombination für den ersten PCR Schritt Genotyp 1a-spezifische Primer verwendet wurden, lässt sich der Rückschluss ziehen, dass diese sehr gut funktionieren. Anschließend wurde im zweiten Experiment die PCR1 mit pan-genotypischen Primerkombination 6069-F und 7542-F WO4 durchgeführt.

Abbildung 14 B präsentiert die Auswertung der Kapillarelektrophoresen der einzelnen Primer-Kombinationen. Es lassen sich mit einer sehr hohen Bandenintensität erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte erkennen. Dabei zeigte sich, dass der neue Primer 6852-R sowohl mit den Genotyp 1a-spezifischen Primer 5d-F bzw. 5d-R wie auch mit dem Genotyp-Unabhängigen 6105-F Primer Fragmente der erwarteten Größe amplifizieren kann. Vergleicht man nun die Auswertung der PCR-Produkte mit

dem alten 6852-R Primer und der Vervielfältigung der TaKaRa-Polymerase unter Kapitel 4.6 lässt sich eine deutliche Verbesserung der Funktionalität des neu entwickelten Primer erkennen.

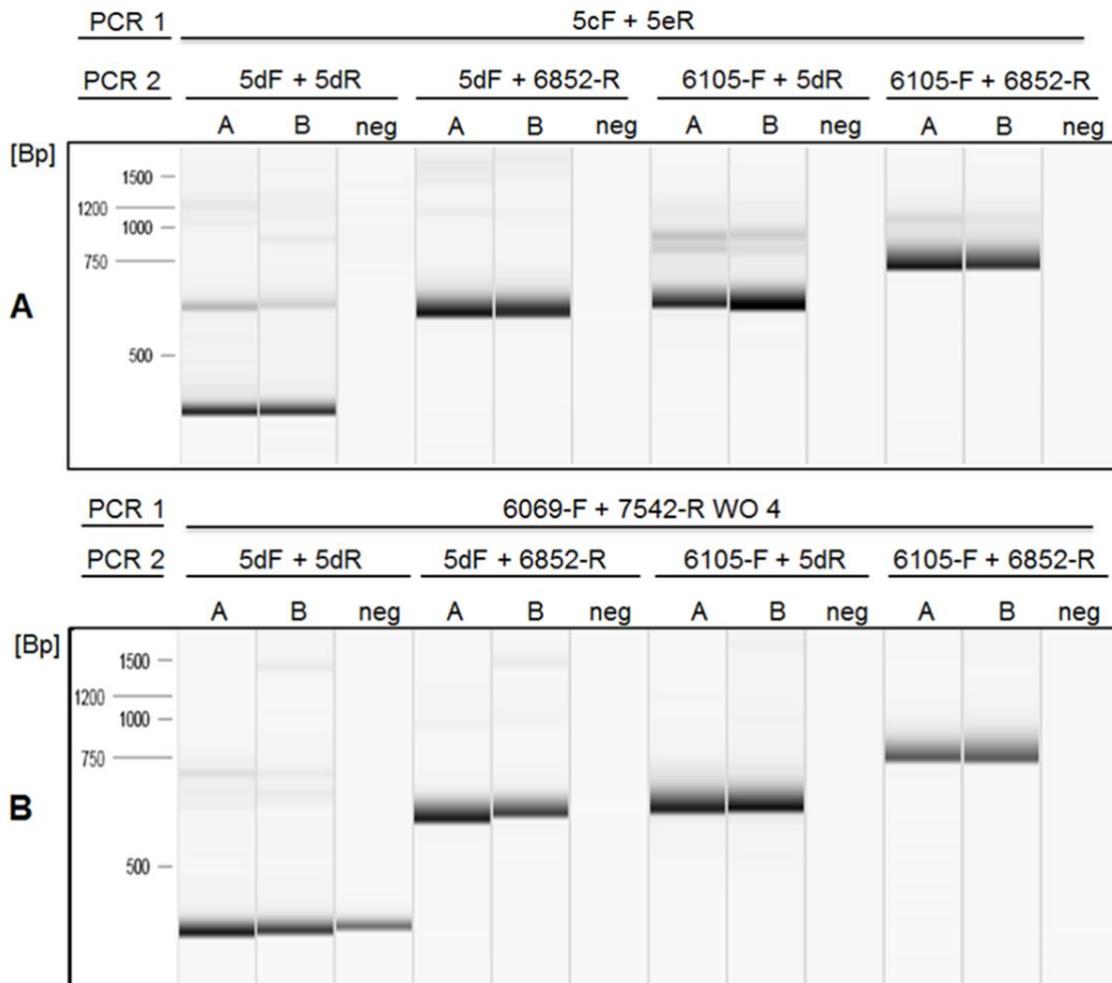


Abbildung 14: Testung der neu entwickelten Reverseprimer 6852-R für PCR2

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Amplifikation mit dem neu entwickelten Reverseprimer 6852-R für PCR2. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie in Abbildung 9 und wie unter 3.3.3 beschrieben. Die PCR-Produkte der einzelnen Primer-Kombinationen bestehend aus Genotyp 1a und Universal-Primer wurden mit der TaKaRa Ex Taq Hotstart Version Polymerase und dem neu entwickelten Reverseprimer 6852-R amplifiziert. Die Kapillarelektrophorese weist pro Kombination jeweils spezifische Banden von hoher Intensität auf. Die DNA-Fragmentlängen der einzelnen PCR-Produkte entsprechen den zu erwartenden Längen von 428 Bp, 570 Bp, 605 Bp und 747 Bp

4.8 Etablierung eines Universalprimer-Protokolls

In den vorherigen Kapiteln wurde die Etablierung einer universellen Primer-Kombination beschrieben. Diese besteht aus: 6069-F + 7542-R WO4 + 7541-R GT4 für PCR1 und für PCR2 aus 6105-F + 6852-R.

Da die etablierte Primer-Kombination für alle weiteren Experimente verwendet wurde, werden in den kommenden Abbildungen die PCR1 und PCR2 Schritte nicht mehr betitelt.

PCR 1

6069-F + 7542-R-WO 4 + 7541-R-GT 4

PCR 2

6105-F + 6852-R

4.9 Effektivität der etablierten Primer-Kombination bei anderen Genotypen

Die Testung der etablierten Primer-Kombination erfolgte bisher nur mit Genotyp 1a. Um ein pan-genotypisches NS5A-PCR Protokoll einführen zu können, muss auch die Wirksamkeit bei anderen Genotypen getestet werden.

Hierzu wurden Patientenproben mit unterschiedlichen Genotypen amplifiziert. Das Ergebnis der Amplifikation in Abbildung 15 zeigt für die Genotypen 1a (VL:1.317.856) und 1b (VL: 5.520.486) ein adäquates Amplifikat. Die zu erwartenden DNA-Fragmente in korrekter Größe wurden für Genotyp 3a (VL: 5.392.199) vervielfältigt. Genotyp 4 (VL: 116.642) und 4d (VL: 5.483.532) weisen in der Amplifikation ebenfalls Banden mit der entsprechenden DNA-Fragmentgröße auf.

Lediglich die Amplifikation des PCR-Produkts für Genotyp 2 (VL: 4.695.992) und 2(i) (VL: 1.429.941) ist nicht effizient. Somit hat das Universalprimer-Protokoll bei den einzelnen Genotypen bis auf die Vervielfältigung der Genotyp 2 und 2(i) funktioniert.

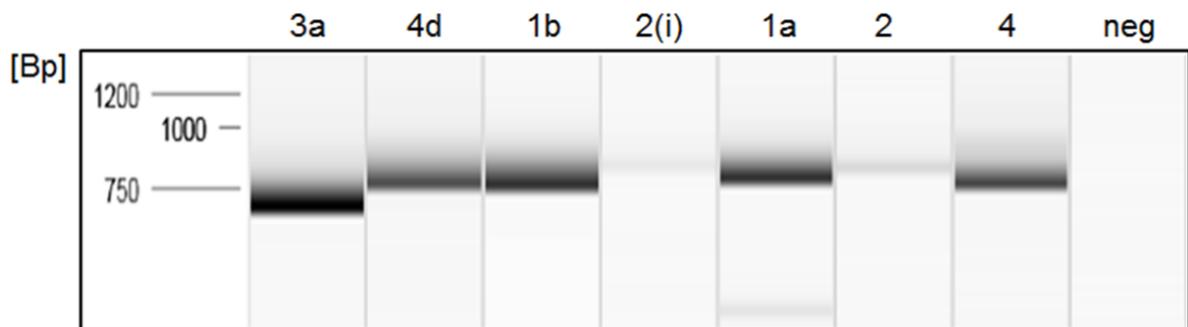


Abbildung 15: Testung der Funktionsfähigkeit des etablierten Primerprotokolls bei der Amplifikation weiterer Genotypen

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Effektivität der etablierten Primerkombination in Anwendung auf andere Genotypen. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.8. Ziel des Experiments war es, die Effektivität bei anderen Genotypen des etablierten Universalprimer-Protokolls zu testen. Das etablierte Primer-Protokoll erzeugt für die verschiedenen HCV Genotypen, bis auf Genotyp 2(i) und 2 saubere PCR-Produkte mit einer Fragmentgröße von 747 Bp.

4.10 Einfluss verschiedener Viruslasten auf die Effektivität der etablierten Primer-Kombination

Um die Aussagekraft der Leistung des Universal-Primer-Protokolls zu verbessern, wurden die einzelnen Genotypen hinsichtlich verschiedener Viruslasten getestet. Hierzu wurden sieben verschiedene Patientenproben für den jeweiligen Genotyp in absteigender Viruslast getestet (siehe Abbildung 16). Zur übersichtlicheren Darstellung der Zahlen wurden die Viruslasten im Logarithmus zur Basis 10 angegeben. Das Ergebnis der Genotyp 1a Testung ergibt mit einer Viruslastspanne von 7,07 log IU/ml bis 4,35 log IU/ml spezifische Banden. Bei Genotyp 1b wurde ein PCR-Produkt nur von 6,49 log IU/ml bis 5,20 log IU/ml amplifiziert. Im Bereich von 3,44 log IU/ml und 2,93 log IU/ml wurden keine Banden generiert. Für Genotyp 3a weist die Kapillarelektrophorese für die Viruslast 7,19 log IU/ml bis 5,23 log IU/ml IU/ml spezifische PCR-Produkte auf. Positive Banden wurden ebenfalls für Genotyp 4a von 6,95 log IU/ml bis 4,95 log IU/ml vervielfältigt. Bei einer Viruslast von 2,39 log IU/ml ist jedoch kein PCR-Produkt sichtbar.

Vergleicht man die Auswertung der Viruslasten für die einzelnen Genotypen fällt auf, dass selbst bis zu einer sehr niedrigen Viruslast von (3.44 log IU/ml) spezifische Banden erzielt werden konnten. Um einen Cut-off zu ermitteln, bis zu welcher Höhe der Viruslast das PCR-Protokoll funktionsfähig ist, sollte nach Abschluss der Optimierungsphase, eine repräsentative Kohorte zusammengestellt werden.

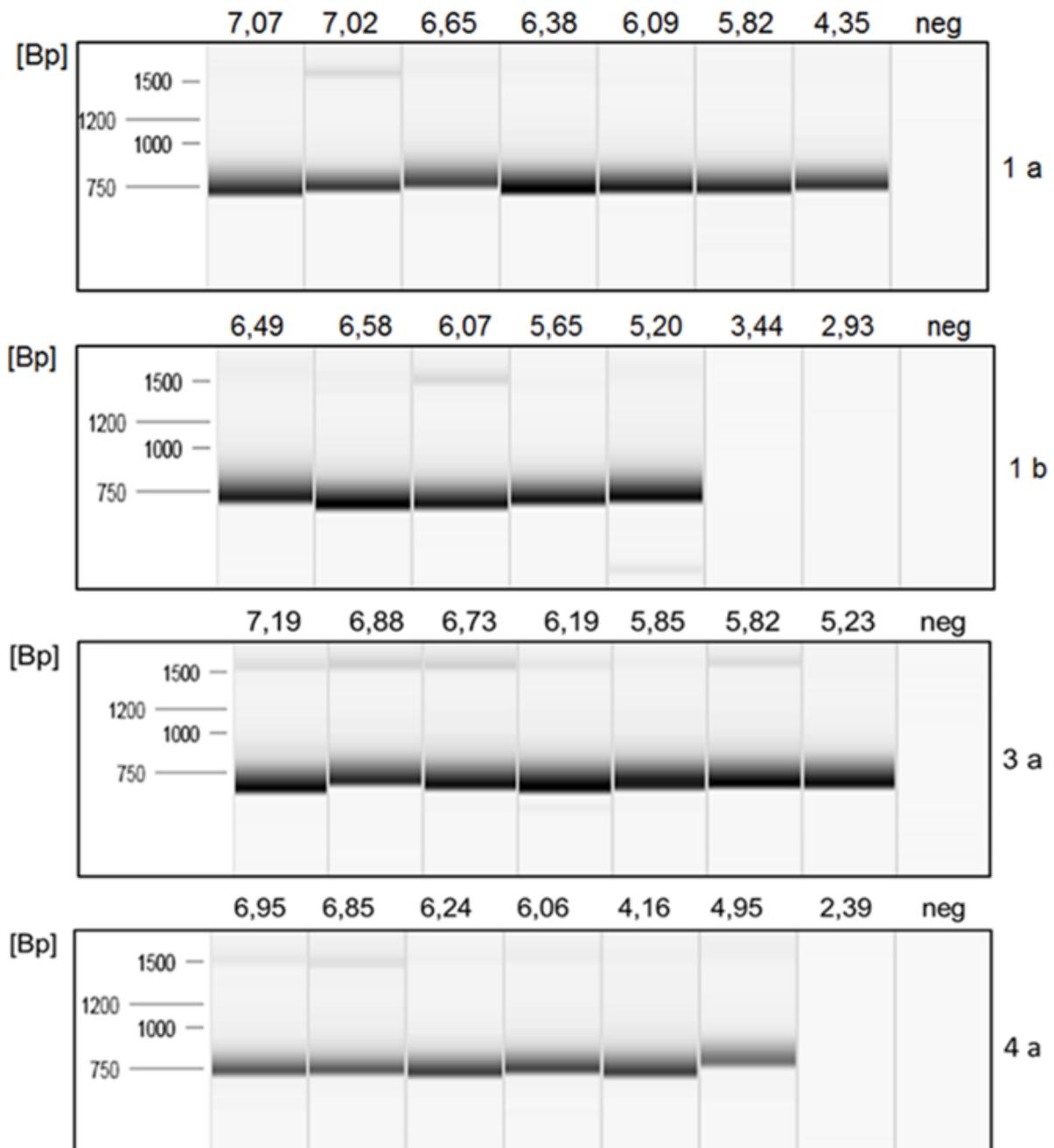


Abbildung 16: Testung der Wirksamkeit des etablierten Primerprotokolls bei der Amplifikation von Genotypen mit diversen Viruslasten

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Wirksamkeit der Amplifikation von HCV-Genotypen mit unterschiedlichen Viruslasten unter Einsatz des neu etablierten Primerprotokolls. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.8. PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.3.3. Die Auswertung der Kapillarelektrophorese weist für Genotyp 1a von $7,07^{10}$ IU/ml bis $4,35^{10}$ IU/ml positiv zu wertende Banden auf. PCR-Produkte für Genotyp 1b wurden von $6,49^{10}$ IU/ml bis $5,20^{10}$ IU/ml generiert. Ab $3,44^{10}$ IU/ml sind keine spezifischen Banden mehr sichtbar. Für Genotyp 3 wurden von $7,19^{10}$ IU/ml absteigend bis $5,23^{10}$ IU/ml reine PCR-Produkte vervielfältigt. Bei Genotyp 4a sind von $6,95^{10}$ IU/ml bis $4,95^{10}$ IU/ml saubere Banden sichtbar. Ab $2,39^{10}$ IU/ml wurde jedoch kein PCR-Produkt amplifiziert. Die Banden sind jeweils in der zu erwartenden Dann-Fragmentlänge von 747 Bp sichtbar.

4.11 Testung Amplifikation von Genotyp 4d

Da die Amplifikation der sogenannten „epidemischen-Subtypen“ 1a, 1b und 3a sowie für den in Zentralafrika und im Mittleren Osten dominierenden Subtyp 4a in Abhängigkeit verschiedener Viruslasten sehr gut funktioniert hat, wurde der Frage nachgegangen, wie das PCR-Protokoll den vorwiegend durch MSM (Männer die mit Männern Sex haben) in Europa eingeführten Genotyp 4d vervielfältigt [10].

Hierzu wurden in Abbildung 17 im Vergleich zu einer Genotyp 4a Probe sechs Patientenproben des Genotyps 4d aufgetragen. In diesem Versuch konnte mit dem etablierten Primer-Protokoll Genotyp 4d mit erfolgreich amplifiziert werden. Dies bestärkt, dass die unter 4.8 etablierte Primer-Kombination auch den Genotyp 4d effizient vervielfältigt.

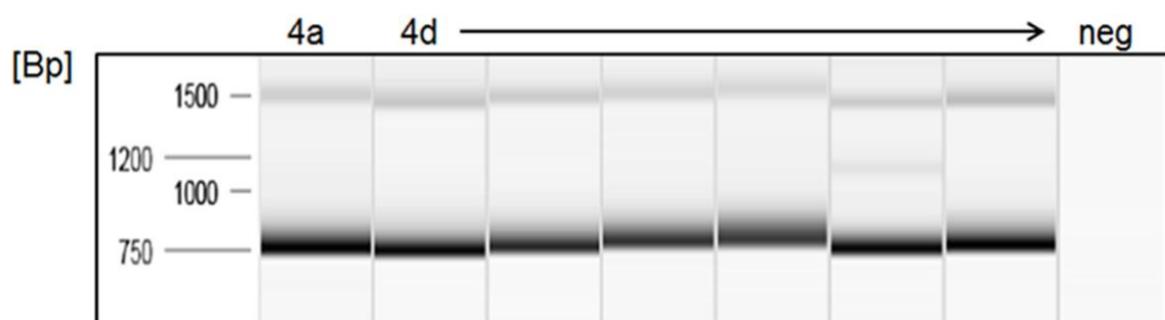


Abbildung 17: Testung der Amplifikation von Genotyp 4d mit dem neu etablierten Primer-Protokoll

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese mit dem Nachweis der Primer-Funktionalität für die Amplifikation von Genotyp 4d. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.8. PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.3.3. Die QIAxcel®-Kapillarelektrophorese weist für die Genotyp 4a und Genotyp 4d Patientenproben spezifische Banden auf. Amplifikat entspricht der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße von 747 Bp.

4.12 Optimierung des Primer-Protokolls hinsichtlich Genotyp 2

Zusammenfassend lässt sich bis hier feststellen, dass die Amplifikation der Genotypen 1a, 1b, 3a, 4a und 4d in den einzelnen Experimenten erfolgreich gewesen ist. Offen ist allerdings noch, weshalb die Vervielfältigung von Genotyp 2 (siehe Kapitel 4.9) ausgeblieben ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die Testung nur mit zwei Genotyp 2 Patientenproben erfolgte, war es wichtig weitere Proben zu testen.

Zu diesem Zweck wurden in der PCR unter Abbildung 18 eine Genotyp 2, zwei Genotyp 2c und drei Genotyp 2b Proben zusammen mit einer Genotyp 1b Patientenprobe analysiert. Die zusätzliche Genotyp 1b Probe diente als Kontrolle, welche mit dem optimierten Primer-Protokoll erfolgreich amplifiziert wurde. Während die als Positivkontrolle amplifizierte Genotyp 1b funktionierte, haben von den Genotyp 2-Proben nur drei von sechs gut funktioniert. Eine Probe wurde nur grenzwertig amplifiziert.

Da die Viruslasten der sechs Genotyp 2 Proben in einem Rahmen von 4,74 log IU/ml bis 4,01 log IU/ml keiner zu großen Diversität unterliegen, ist die Viruslast als Störfaktor für die Effektivität der Polymerasen-Kettenreaktion auszuschließen. Bei der genauen Analyse (siehe Abbildung 18) zeigte sich, dass der konservierte Teil der Universalprimer suboptimal auf Genotyp 2 passte.

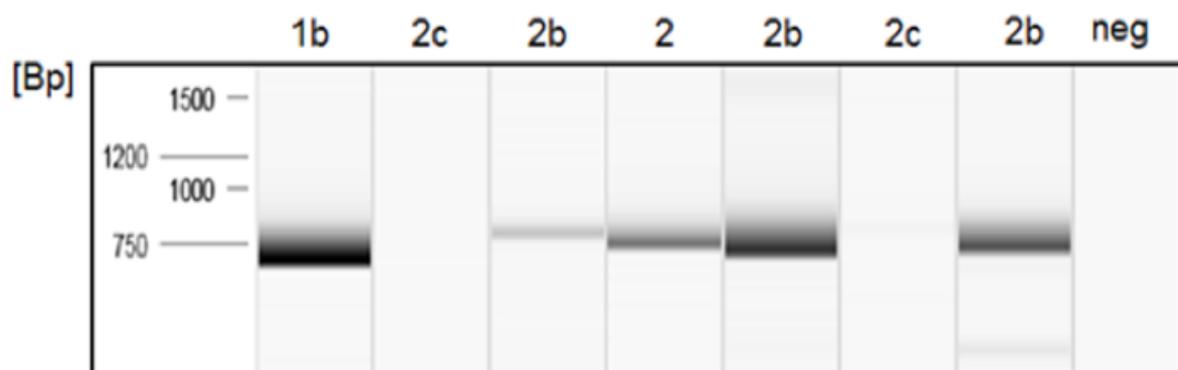


Abbildung 18: Testung der Amplifikation verschiedener Genotyp-2-Proben für den Vergleich der Effizienz des optimierten Primer-Protokolls

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese mit der Amplifikation unterschiedlichen Genotyp 2-Proben um die Funktionalität des Primer-Protokolls hinsichtlich Genotyp 2 vergleichen zu können. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.8. PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.3.3. Für Genotyp 1b und zweimal für Genotyp 2b wurde erfolgreich ein PCR-Produkt amplifiziert. Die dazugehörige Bandengröße entspricht 747 Bp. Die für Genotyp 2 vervielfältigte Bande hat eine geringere Intensität, gibt jedoch die korrekte Größe des DNA-Fragmentes an. Die Genotyp 2c Proben wurden nicht erfolgreich amplifiziert.

Um eine bessere Bindekapazität der Genotyp 2-Primer zu erreichen, wurden diese mittels der Sequenzanalyse-Software Geneious® 10.2.2 (siehe Kapitel 3.1.6) optimiert. Gemäß des *Ambiguity Code* (siehe Kapitel 4.7 und Tabelle 6) wurde durch das Auswechseln der Nukleosidbasen Sequenz-Variationen im hiesigen Primer-Set reduziert [77].

Die Änderungen der Primer-Sequenz sind unter Abbildung 19 aufgeführt.

Hierzu wurden im Forward-Primer 6217-F zwei degenerierte Basen gegen einen „Y“ und eine Cytosin Base ausgetauscht. Ein „Thymin“ im ursprünglich verwendeten Primer wurde gegen ein „Guanin“ ausgetauscht und der neue Primer wurde um drei weitere Nukleotide verlängert. Der Reverse-Primer 6922-R wurde ebenfalls um drei Nukleotide erweitert. Zudem wurden drei *Ambiguities* (R, N, N) gegen drei weitere *Ambiguities* (N, Y, Y) ausgetauscht. Eine degenerierte Base wurde durch die Base Thymin ersetzt.

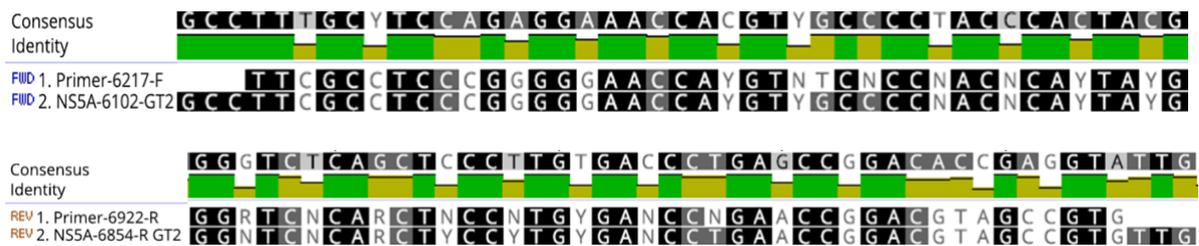


Abbildung 19: Optimierung der Bindekapazität der Primer 6217-F GT2 und 6922-

Um die Bindekapazität für die Amplifikation von Genotyp 2 Proben zu verbessern, wurden die Primer 6217-F GT2 und 6922-R GT2 mittels Geneious® 10.2.2 optimiert. Der Forward-Primer 6217-F GT2 und der Reverse-Primer 6922-R GT2 wurden hinsichtlich abweichender Varianzen zur Konsensus-Sequenz korrigiert.

Um die neuen Primer zu testen, wurden die Genotyp 2 Patientenproben in identischer Reihenfolge mit den neuen Primer amplifiziert. Es lassen sich für alle Genotyp 2 Proben spezifische Banden mit einer entsprechenden DNA Fragmentlänge von 747 und mit derselben Bandenintensität wie für Genotyp 1b in Abbildung 20 erkennen. Konkludierend wurde festgestellt, dass mit dem optimierten Genotyp 2-Primer für den zweiten PCR-Schritt die bisher nicht amplifizierbaren Genotyp 2-Typen erfolgreich vervielfältigt werden konnten.

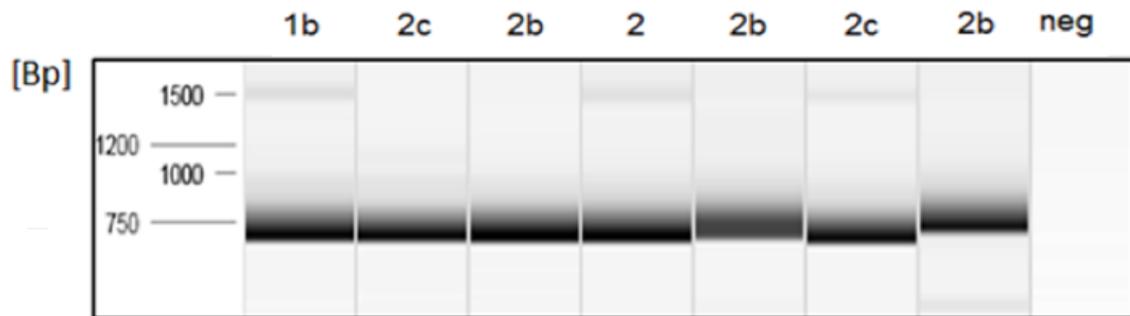


Abbildung 20: Testung der Amplifikationseffizienz mit dem optimiertem Primer-Protokoll für Genotyp 2

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese mit der Amplifikation diverser Genotyp-2-Proben mit dem für Genotyp-2 optimierten Primer-Protokoll. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.8. PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.3.3. Nach Optimierung der PCR2 Primer ließ sich in der Kapillarelektrophorese eine erfolgreiche Amplifikation erkennen. Für alle Genotyp 2 Patientenproben wurden positiv zu wertende PCR-Produkte generiert. Die Banden besitzen allesamt die zu erwartende DNA-Fragmentlänge von 747Bp, sowie eine ähnliche Intensität der einzelnen Banden.

4.13 Einführung eines pan-genotypischen NS5A-PCR Protokolls

Durch die Optimierung des vorher verwendeten Primer-Protokolls (siehe 4.8) konnten die bisher nicht amplifizierbaren Genotyp 2-Patientenproben, insbesondere Genotyp 2c-Patientenproben, vervielfältigt werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde beschlossen, die neuen Genotyp 2-spezifischen Primer mit in die Kombination aufzunehmen.

Dieses war der letzte Schritt der Etablierungsphase für ein pan-genotypisches NS5A-PCR-Protokoll.

PCR 1 6069-F + 7541-R-GT4 + 7542-R-WO4

PCR 2 6105-F + 6102-F-GT2 + 6852-R + 6854-R-GT2

4.14 Übersicht der Effektivität des etablierten pan-genotypischen NS5A-PCR-Protokolls für die Genotypen 1-6

Nachdem es gelungen war, den vorwiegend in Westafrika und Asien dominierenden Genotyp 2 inklusive Subtypen zu amplifizieren, wurde getestet, ob das Universal-Primer-Protokoll auch für in hiesigen Breitengraden nicht vorkommende, exotische Genotypen funktionstüchtig ist.

Hierzu wurden zwei Patientenproben mit Genotyp 5a und 6a getestet. Diese wurden aufgrund der Tatsache, dass Genotyp 5 ursprünglich und vorwiegend im südafrikanischen Raum verbreitet ist und Genotyp 6 dem süd-ostasiatischen Raum zuzuordnen ist, „exotisch“ genannt [10].

Um zusätzlich eine Übersicht der pan-genotypischen Effizienz zu erhalten, wurden alle verfügbaren Genotypen getestet. Der jeweilige Genotyp konnte mit dem neu etablierten Primer-Protokoll erfolgreich vervielfältigt werden. Die spezifischen Banden entsprachen den zu erwartenden Größen von 747 Bp. Das Resultat der Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 21 aufgeführt. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine pan-genotypische NS5A Primer-Kombination entwickelt werden konnte, die es ermöglicht, nicht nur die global am weitesten verbreiteten Genotypen 1a-b, 3a und 4a, sondern auch die im europäischen Raum selteneren Genotypen 2b-c, 4d, 5a und 6a, zu amplifizieren [1].

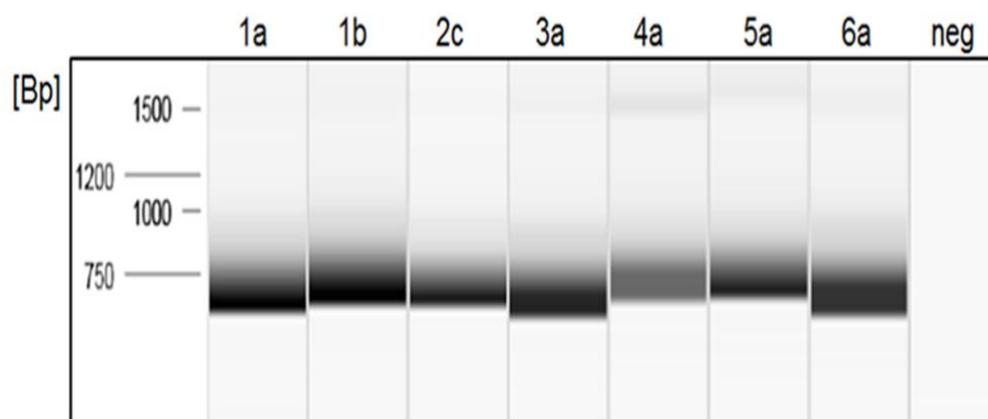


Abbildung 21: Testung der Amplifikation der Genoytphen 1-6 mit der neu modifizierten Primer-Kombination.

Zu sehen ist eine Kapillarelektrophorese zum Nachweis der Effizienz des unter 4.13 modifizierten Universal-Primer-Protokolls für die HCV-Genotypen 1-6. Namen der verwendeten Primer siehe Kapitel 4.13. PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.3.3. Für die einzelnen Genotypen lassen sich jeweils spezifische PCR-Produkte mit der korrekten DNA-Fragmentlänge von 747 Bp erkennen.

4.15 Analysen der HCV-Patienten-Kohorte am Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf

4.15.1 Verteilung der Viruslast innerhalb der Kohorte

Nach Validierung der Primer- und Polymerasen-Kombinationen wurden 262 HCV-RNA positive Patientenproben mit bekannten Genotyp mittels core-Sequenzierung aus dem Zeitraum 2015 bis 2017, mit dem pan-genotypischen NS5A-PCR Protokoll erneut amplifiziert. In der Kohorte waren die Genotypen 1-7 vertreten (Tabelle 5). Mit einer Spannbreite von $248\text{-}21 \times 10^6$ IU/ml beträgt der ermittelte Median der Viruslast 1.07×10^6 IU/ml.

Die Amplifikation des erwarteten 747Bp Fragments war in 257 von 262 (98,1%) Patientenproben erfolgreich. Die fünf nicht amplifizierbaren Proben wiesen alle eine sehr geringe Viruslast (<3000 IU/ml) auf und darüber hinaus konnten drei der fünf negativen Proben keinen spezifischen Genotyp, mittels NS5A Sequenzierung zugeordnet werden konnte (Tabelle 7).

Es wurden 11 von 16 Proben (68,8%) mit einer Viruslast <20.000 IU/ml positiv vervielfältigt, wobei sich bemerkenswerter Weise auch eine Probe mit einer Viruslast von 752 IU/ml fand (Tabelle 7). Die Genotypisierung und Resistenztestung der Amplikons wurde mittels Sequenzierung der unter Kapitel 4.13 etablierten Primer-Kombination durchgeführt [1].

Tabelle 7: Übersicht der Genotyp Verteilung der Patientenproben

Typ	Anzahl der Proben	Subtyp													
		*	a	b	1b/2k	c	d	e	f	h	j	k	l	n	t
1	144	1	57	82	3								1		
2	18	2	1	8		4		1	1		1				
3	68		65	1						2					
4	26		11				13					1		1	
5	3		1					2							
6	2								1						1
7	1		1												
total	262														
*keine Zuordnung															

4.15.2 Verteilung der Genotypen innerhalb der Kohorte

Um zu klären, ob die Sequenzierung von NS5A zur Genotyp- und Resistenz-Vorhersage mindestens genauso zuverlässig ist als die Sequenzierung der Core-Region, wurden alle 257 NS5A Fragmente der erfolgreich amplifizierten Proben aus der Kohorte sequenziert.

Für die Analyse wurden die NS5A-Amplikons mit dem unter 4.13 vorgestellten pan-genotypischen NS5A-PCR Protokoll sequenziert und mit dem von Smith [17] zur Verfügung gestellten Referenzdatensatz abgeglichen.

Ein phylogenetischer Baum wurde durch die *Neighbour-Joining* mit dem Tamura-Nei-genetischen Distanz-Modell erzeugt (siehe Kapitel 3.3.12) [78].

Für den entsprechenden Vergleich wurden zudem auch die Core-Sequenzen aus der Routinediagnostik durch einen phylogenetischen Baum dargestellt. Die Äste des phylogenetischen Baums wurden entsprechend der Genotypen farblich gruppiert. Nicht übereinstimmende, so genannte diskrepante Sequenzen wurden schwarz markiert (Abbildung 22).

Die Genotyp-Information der Core-Sequenzierung in Relation zur NS5A-Sequenzierung ergab eine hohe Konkordanz von 95,7% der Geno- und Subtypen. Nur 11 von 257 Sequenzen (4,3%) stimmten nicht überein (Tabelle 8). Hierzu muss angemerkt werden, dass von den 11 nicht übereinstimmenden Sequenzen jedoch nur sechs als „echte“ Diskrepanzen zu betrachten sind.

Drei Patientenproben wiesen für die Core-Region den Genotyp 2k und für die NS5A-Region den Genotyp 1b auf. Hierbei handelt es sich um keine Diskrepanz per se, sondern um eine Infektion mit dem rekombinanten HCV-Stamm (RF1_2k/1b), die, rückblickend auf den Entdeckungsort, auch als „St. Petersburg Variante“ bekannt ist [73, 79].

Bei zwei weiteren Proben konnte die Core-Region aufgrund einer scheinbar zu niedrigen Viruslast nicht amplifiziert werden. Diese Proben wurden daher nicht gewertet und aus diesem Grunde aus dem Studienprotokoll entfernt.

Eine weitere Probe wurde in der Core-Region als 2k/1b Rekombination klassifiziert und in NS5A Genotyp-2d/f zugeordnet. Bei den restlichen diskrepanten Proben wurde zwar der richtige Genotyp, jedoch ein diskrepanter Subtyp zugewiesen (Core/NS5A: 1i/1d, 2b/2t, 2k/2c) (Tabelle 8).

Um die diskrepanten Sequenzen genauer zu untersuchen, wurden - da eine simultane Genotypisierung und Resistenztestung mit einem Prädiktionsalgorithmus

wie Geno2Pheno_[HCV] (3.3.11) generell möglich ist - die NS5A-Sequenzen mit eben diesem Prädiktionsalgorithmus analysiert. Im Vergleich zur phylogenetischen Analyse prognostizierte Geno2Pheno_[HCV] für die NS5A-Region 248 von 257 (96,5%) richtige Genotypen. Die Abweichungen schließen erneut die drei HCV-Rekombinanten und die Proben, die bereits im NS5A-Baum diskrepant waren, mit ein (Tabelle 7).

Tabelle 8: Unterschiede in der Sequenzanalyse in der jeweiligen HCV-Sequenzierung mit Core, NS5A und Geno2Pheno_[HCV]

Patientennummer	gemeldete Genotypen	Baum Core-Sequenz	NS5A Geno2Pheno _[HCV]	Baum NS5A-Sequenz
D16-56229	2k/1b	2k	1b (91%)*	1b
D17-32430	2k/1b	2k	1b (91%)	1b
D17-44030	2k/1b	2k	1b (91%)	1b
D17-32482	2k/1b	2q	2f (85 %)	2f
D15-55572	1	1i	1b (71%)	1d
D17-17662	1	1h	1a (79%)	1h
D17-51295	1	1h	1a (80%)	1h
D16-28550	2	2b	2f (74%)	2t
K15-15437	2	2k	2c (83%)	2c
K15-14056	2	na	2j (77%)	2j
K16-15438	5	na	7a (76%)	7a
* % = prognostizierte Sequenzhomologie				

Es wurden zwei weitere Proben in der phylogenetischen Analyse der Core- und NS5A-Region als Genotyp 1h deklariert und von Geno2Pheno_[HCV] als Genotyp 1a prognostiziert. Erstaunlicherweise wurde für diese beiden Proben eine geringe Sequenzhomologie von 79% und 80% zum Referenzstamm berichtet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die auf NS5A basierende Genotypisierung zuverlässig ist und eine Prädiktion mit Geno2Pheno_[HCV] beinahe so verlässlich wie die phylogenetische Analyse ist. Bei Isolaten, die in Geno2Pheno nur eine geringe Sequenzhomologie <75% aufweisen empfiehlt es sich eine zusätzliche phylogenetische Analyse durch zu führen [1].

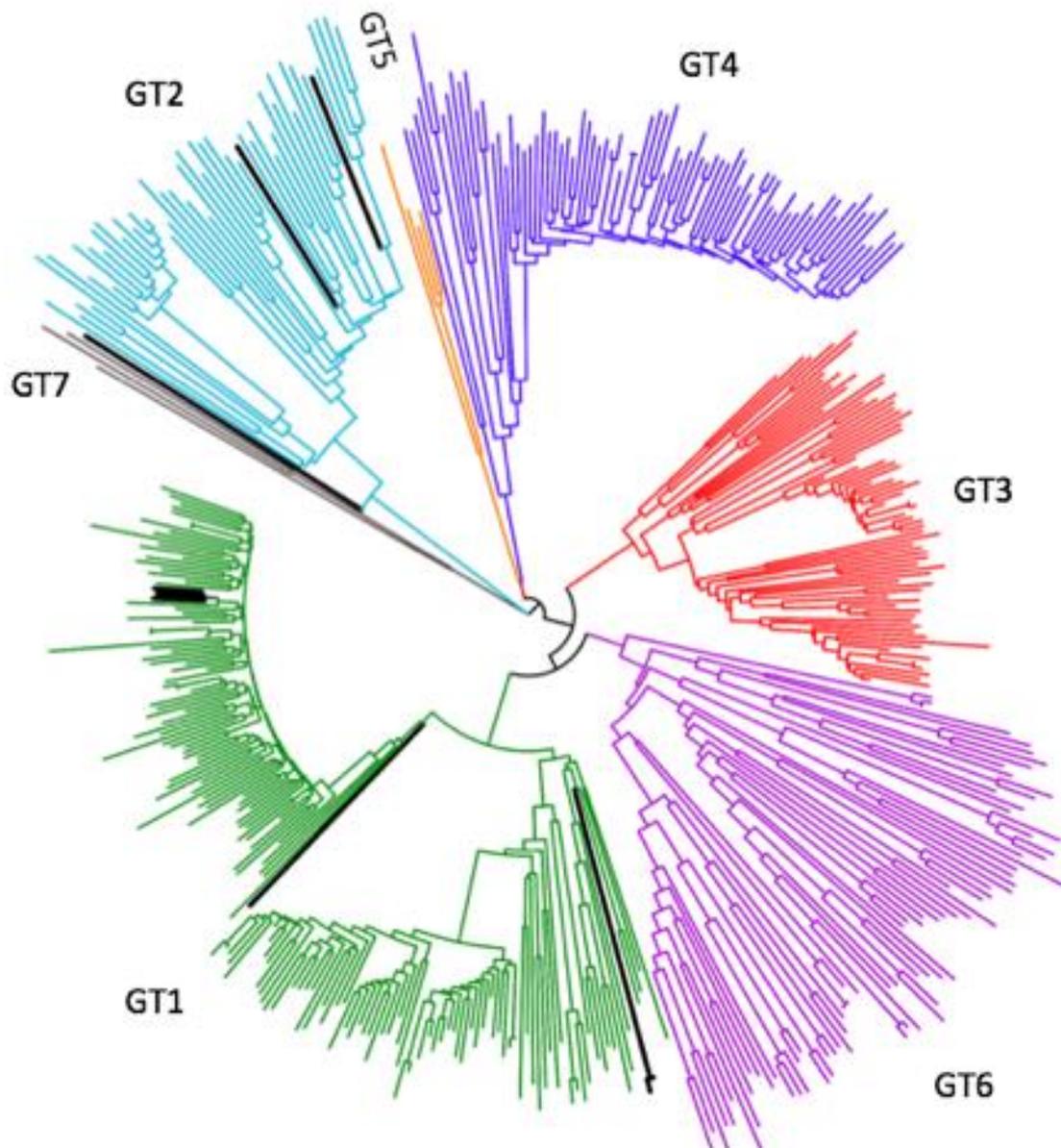


Abbildung 22: Phylogenetische Sequenzanalyse von NS5A-Amplikons

Zu sehen ist ein phylogenetischer Baum mit 257 HCV-Patienten, welche mit dem etablierten pan-genotypischen NS5A-PCR-Protokoll sequenziert wurden und mit dem von [17] zur Verfügung gestellten Referenz-Datensatz verglichen worden sind. Der Baum wurde durch die *Neighbour-Joining-Methode* mit dem Tamura-Nei-genetischen Distanz-Modell hergestellt. Zur Anfertigung des Baumes wurden die Programme Geneious R.10 und zur Visualisierung iTOL3 verwendet (siehe 3.3.12).

4.15.3 Verteilung der Resistenzen innerhalb der Kohorte

Die Sequenzen der Kohorte wurden auf Resistenzen mit Geno2Pheno_[HCV] analysiert. Innerhalb der getesteten Kohorte ist das Vorkommen von Resistenz-assoziierten Substitutionen (RASs) gering. Nur bei 23 von 257 (8,9%) Patienten sind Resistenzen

aufgetreten, und zwar vorwiegend bei Genotyp 1a, gefolgt von Genotyp 1b, Genotyp 4 und Genotyp 3 (Tabelle 9).

Zusätzlich wurden Resistenzen in zwei Proben ohne zugehörigen Subtyp vorhergesagt. In der Genotyp 1-Probe sind die Polymorphismen 28L, 30R und 58P vorhanden, und in der Genotyp 3 Probe dominieren die Substitutionen 30K und 31M.

Tabelle 9: NS5A-Resistenz-assoziierte Substitutionen (RAS) innerhalb der Kohorte

Subtyp	RAS's									
	28T	30E	30H	30R	31M	31M, 93H	31V, 93H	93H	28L, 30R, 58P	30K , 31M
1a	2	1	1	2						
1b					2	4	1	5		
1*									1	
3a								1		
3*										1
4a				1						
4d	1									
*keine Zuordnung										

4.15.4 Vergleichsanalyse zu einem einstufigen pan-genotypischen NS5A Amplifikationsprotokoll

Parallel zur Etablierung dieser neuen Diagnostikmethode wurde von Andre-Garnier ein Protokoll für eine einstufige pan-genotypische NS5A-Amplifikation veröffentlicht [74]. Um einen direkten Vergleich der beiden Protokolle zu erhalten, wurde die virale RNA gemäß Protokoll [74] in cDNA transkribiert und anschließend wurde die Amplifikationseffizienz durch eine Titrationsreihe untersucht. Im Vergleich (unter Abbildung 23) lässt sich eindeutig erkennen, dass beide Verfahren in der Lage waren, das NS5A-Fragment jeweils zu vervielfältigen.

Erfreulicherweise war die Amplifikation, im Sinne einer deutlicheren Bandenintensität, in dem hier untersuchten Zwei-Schritt-Protokoll als effizienter zu werten als bei dem Ein-Schritt-Protokoll.

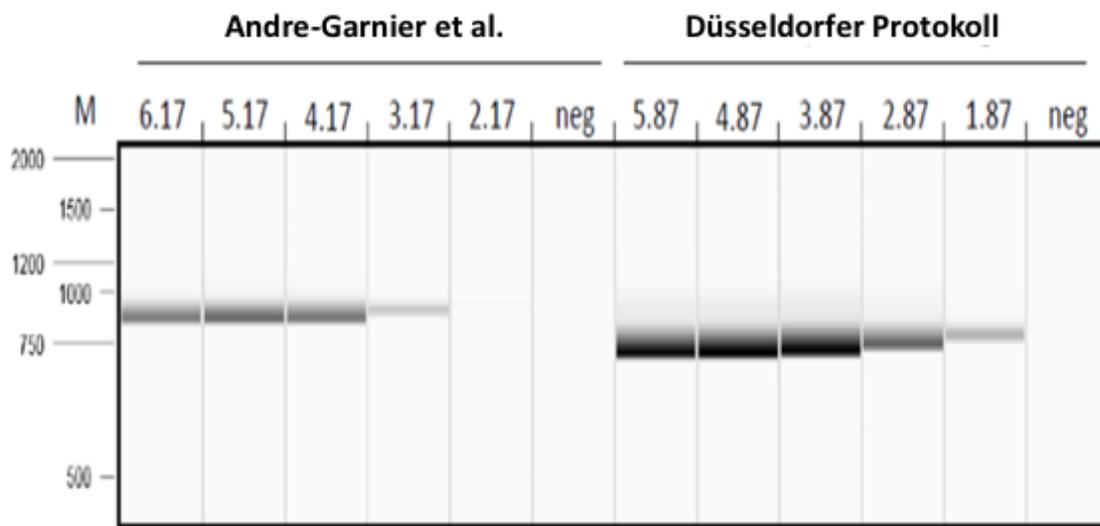


Abbildung 23: Direkter Vergleich der Wirksamkeit der unterschiedlichen NS5A-Amplifikations Protokolle

Die Effizienz der NS5A-Amplifikation wurde durch eine serielle Verdünnung von HCV-cDNA (Ausgangsviruslast 2.2×10^7 IU/ml) und mit den angegebenen Protokollen analysiert. Die PCR-Produkte wurden unter Nutzung des QIAxcel Advanced Systems (siehe 3.3.4) getrennt. Da die Protokolle unterschiedliche Mengen an Ausgangs-RNA verwenden, ist die Viruslast pro Reaktion zur besseren Beurteilung der Amplifikationseffizienz angegeben. Beide Protokolle waren in der Lage, die niedrigste Verdünnung (entspricht 1000 IU/ml Plasma) zu vervielfältigen, jedoch in unterschiedlicher Intensität.

Für einen direkten Vergleich von klinischen Proben wurde ein Kollektiv an seltenen Genotypen und allen Proben, aus der hier untersuchten Kohorte mit einer Viruslast < 20.000 IU/ml, nebeneinander aufgeführt und amplifiziert (siehe Tabelle 10).

Bei der Amplifikation der Genotypen sind keine Unterschiede aufgefallen. Es traten jedoch Differenzen in der Amplifikation bezogen auf die Viruslast auf. Insgesamt wurden 11 von 16 Proben (68,75%) mit unserem nested-PCR-Protokoll erfolgreich amplifiziert, wohingegen mit dem bereits veröffentlichten Protokoll nur 7 von 16 Proben (43,75%) amplifiziert werden konnten [1].

Es kann festgehalten werden, dass die Vervielfältigung des erwarteten 747bp-Fragments bei 257 von 262 (98,1%) Proben erfolgreich war. Es ließen sich auch Proben mit niedriger Viruslast (< 1000 IU/ml) amplifizieren. Die Genotyp-Prädiktion mittels NS5A-Sequenzierung zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der bisherigen Genotypbestimmung durch eine Core-Sequenzierung von 97,3%. Nur bei relativ seltenen Subtypen traten Diskrepanzen auf; Resistenzen ließen sich in 23 von 257 (8,9%) der Proben mit der Resistenzanalyse Geno2Pheno_[HCV] ermitteln [1].

Tabelle 10: Vergleich der verschiedenen pan-genotypischen Ansätze für die NS5A-Amplifikation

Patienten-ID	Core Genotyp	Viruslast	diese Publikation	Andre-Garnier et al.
D16-36079	4a	248	-	-
D17-23546	1b	715	-	-
D17-36276	3a	752	ja	-
D17-20294	1b	852	-	-
D16-50221	4	948	ja	ja
D16-47267	3a	1970	ja	ja
K16-15343	4a	2288	-	-
D16-57092	3a	2405	ja	-
D17-17585	1a	2797	-	-
D16-41860	3a	3477	ja	ja
D17-21569	1b	4568	ja	ja
D17-24705	1b	6213	ja	ja
D17-38540	1a	9978	ja	-
D17-2015	1b	11254	ja	ja
D16-53895	3a	11675	ja	-
D17-37507	2a	14464	ja	ja

5 Diskussion

Trotz der Verfügbarkeit hochwirksamer Interferon-freier, pan-genotypischer DAA-Therapien kommt es weiterhin in Einzelfällen zu einem Behandlungsversagen [27]. Gründe für ein solches Versagen lassen sich hierbei nicht immer eindeutig eruieren [80]. Ausschlaggebend für die Entscheidungsfindung einer geeigneten DAA-Kombination, sowie das Entstehen von Resistenzen sind HCV-Geno- und Subtyp [70]. Daraus ergibt sich, dass der HCV-Genotyp weiterhin ein wichtiger diagnostischer Parameter ist. Für seltene Genotypen und Rekombinanten ist die Genotypisierung durch Sequenzierung eine der zuverlässigsten Methoden [24, 81]. Die hohe HCV-Heterogenität erfordert hierbei eine hohe Komplexität der Diagnostik [10].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung einer pan-genotypischen HCV-NS5A-Amplifikationsmethode, mit dem Fokus auf eine zuverlässige Genotypisierung mit simultaner Resistenztestung untersucht [1]. Ein weiterführendes Ziel war, die bisherige HCV-Diagnostik im Institut für Virologie der Universitätsklinik in Düsseldorf zu optimieren und dabei eine effizientere, sowie idealerweise auch wirtschaftlichere Untersuchungsmethode zu etablieren.

Untersucht wurde die Amplifikationsstrategie für eine nested-PCR mit Primer, welche zwischen allen Genotypen hochkonserviert sind und daher eine gute Funktionalität aufweisen.

Anschließend wurden, zur Steigerung der Effektivität und Zuverlässigkeit des PCR-Protokolls, verschiedene Polymerasen getestet und miteinander verglichen. Zur Kontrolle der Effektivität und Qualität wurden die verwendeten Primer-Kombinationen mit dem global am weitverbreitetsten Genotyp 1a validiert. Hiernach konnte die Wirksamkeit des Protokolls an anderen Genotypen getestet werden.

Nach der Validierung des pan-genotypischen NS5A-PCR-Protokolls wurden HCV-RNA positive Patientenproben, mit bekanntem Genotyp mit dem neuen Protokoll erneut untersucht. Es wurde verglichen, inwieweit der Genotyp- auf Grundlage der Sequenzierung von NS5A von der herkömmlichen Standarddiagnostik, der Sequenzierung mit HCV-Core, abweicht.

Für die Genotypisierung wurde mittels NS5A- und Core-Sequenzen ein phylogenetischer Baum durch die *Neighbour-Joining* mit dem Tamura-Nei-

genetischen Distanzmodell (siehe 4.15.2) erzeugt. Die Resistenzen wurden anschließend mit dem Prädiktionsalgorithmus Geno2Pheno_[HCV] analysiert (siehe 4.15.3).

Während der Erstellung dieser Arbeit wurde ein weiterer pan-genotypischer Ansatz für die NS5A-Genotypisierung [74] veröffentlicht. Die Unterschiede zum vorliegenden Zwei-Schritt-PCR-Protokoll wurden vergleichend analysiert und sind mit in diese Arbeit aufgenommen worden.

5.1 Etablierung einer pan-genotypischen Amplifikationsmethode der HCV NS5A-Region

Die Hepatitis C Virus-Diagnostik am Universitätsklinikum Düsseldorf erfolgte vor Etablierung dieser Diagnostikmethode in multiplen, voneinander getrennten Schritten (siehe Abbildung 5). Um das diagnostische Handling zu verbessern und einen höheren Informationsgehalt aus einer Patientenprobe zu erhalten, wurde die effizientere pan-genotypische NS5A-PCR-Methode erarbeitet [1].

Für das Entwickeln einer neuen Amplifikationsstrategie, die gleichzeitig die Genotypisierung und Identifizierung von Resistenzen in der NS5A-Region ermöglicht, wurden degenerierte Primer für den N-Terminal-Teil von NS5A entworfen. Diese mussten so gewählt werden, dass die Amplifikation der gesamten NS5A-Region realisiert werden kann (siehe Abbildung 7).

Aus Datenlagen von Zellkulturexperimenten und klinischen Studien war ersichtlich, dass an den Aminosäurepositionen 30 und 93 im NS5A-Protein die wichtigsten beschriebenen Resistenzen liegen [31, 82]. Folglich mussten diese Bereiche obligat mit in die Amplifikation integriert werden und unterlagen somit einer besonderen Berücksichtigung in der Erstellung der Primer. Zur Erhöhung der Bindekapazität zwischen den einzelnen Nukleotidbasen, wurden die Primer dementsprechend mit der Base Inosin, an Stelle von degenerierten Primer-Positionen, ausgestattet. Generell besteht hier jedoch die Problematik, dass nicht alle Polymerasen inosinhaltige Primer gleichermaßen gut akzeptieren und die Effektivität der Sequenzierung daher negativ beeinflusst werden kann [75].

Zur Steigerung der Amplifikationszuverlässigkeit wurden daraufhin verschiedene Polymerasen getestet (siehe 4.6), wobei die TaKaRa Ex Taq Hotstart Polymerase die höchste Amplifikationsrate erzielte (siehe Abbildung 13). Ein entscheidender Vorteil dieser Polymerase ist der Besitz einer „Korrekturlese-Funktion“ in Form einer

3' → 5' Exonuklease. Diese Funktion trägt zur Reduzierung von Fehlerraten während der Transkription bei und erhöht somit die Zuverlässigkeit der Anwendung [76]. Basierend auf diesem Vorteil und der höchsten Sensitivität in der Amplifikation wurde diese Polymerase in das neu entwickelte Protokoll integriert.

Anschließend wurden die in der Datenbank verfügbaren Genotypen 1-7 auf die Funktionalität und Effektivität der gewählten Primer-Kombination getestet.

Lediglich die Amplifikation von Genotyp 2 gestaltete sich in der Studie vorerst problematisch (siehe 4.9 und 4.12). Die vervielfältigten Banden zeigten sich, trotz korrekter Größe des DNA-Fragments, mit einer zu geringen Intensität.

Darüber hinaus ließ sich der Subtyp 2c nicht amplifizieren. Gründe hierfür könnten niedrige Viruslasten oder Sequenzunterschiede sein, die eine effiziente Bindung des Primer verhindern. Dies wurde durch ein neues Set an Genotyp 2 Primer behoben (siehe Kapitel 4.12). Hierzu wurde um die Effektivität des Protokolls in Bezug auf Genotyp 2 zu verbessern, der konservierte Teil der Universalprimer auf die Bindekapazität zum Genotyp 2 mit optimiert (siehe Abbildung 19). Anschließend war die Vervielfältigung von Genotyp 2 erfolgreich. Eine niedrige Virämie, als Auslöser der fehlgeschlagenen Amplifikation konnte somit ausgeschlossen werden. Sollten zukünftig Probleme bei der Amplifikation auftreten, könnten Optimierungen der Primer auf Sequenzebene zur Verbesserung der Bindekapazitäten als Möglichkeit dienen, neue bisher nicht getestete Subtypen erfolgreich zu amplifizieren.

5.2 Schwierigkeiten bei der Etablierung einer neuen Diagnostikmethode aufgrund der HCV-Heterogenität

Bei der Datenerhebung zur Testung der Funktionalität des neu etablierten pan-genotypischen PCR-Protokolls sollten alle zum damaligen Zeitpunkt verfügbaren Genotypen in die Studie mit aufgenommen werden.

In der Universitätsklinik Düsseldorf standen primär die gängigsten Genotypen 1, 3 und 4 zur Verfügung (siehe Kapitel 4.15.2.). Es konnten auch die im hiesigen Breitengrad selteneren Genotypen [10] mit in die Studie aufgenommen werden, und zwar 18 Proben mit dem Genotyp 2, drei Proben mit dem Genotyp 5, zwei weitere Proben mit dem Genotyp 6 und eine Probe mit dem Genotyp 7.

Die Amplifikation der Düsseldorfer Genotypen funktionierte für die häufigen Genotypen sehr gut. Auch auf die selteneren Genotypen 5, 6 und 7 bezogen war die Funktionalität des Protokolls sehr zufriedenstellend. Anfängliche Schwierigkeiten bei

der Amplifikation mit Genotyp 2 ließen sich durch Primer-Optimierungen gut beheben (siehe Kapitel 4.12 und 5.2).

Eine weitere Komplikation stellten niedrige Viruslasten dar. Insbesondere Proben mit einer VL <1000 IU/ml funktionierten nur noch in 30% der Fälle [1]. Da die durchschnittliche Viruslast bei HCV jedoch meistens über 1000.000 IU/ml liegt, sollte dies für die zukünftige Routinediagnostik in der Regel keine Einschränkung darstellen.

Kurz nach Etablierung der neuen Diagnostikmethode und nach der Zusammenstellung dieser Arbeit wurde 2018 in Kanada ein weiterer HCV-Genotyp entdeckt. Vier primär als Genotyp 5 klassifizierte HCV-Infizierte konnten nicht sequenziert werden. Nach Überprüfung der Sequenzanalyse und phylogenetischer Analyse wurde festgestellt, dass es sich hierbei um einen eigenständigen HCV-Genotyp handelt: Genotyp 8. Dieser neu entdeckte Genotyp unterscheidet sich von den zuvor identifizierten HCV-Genotypen 1-7, mit einer mehr als 30%igen Nukleotidsequenzdivergenz von den bisher etablierten HCV-Subtypen [83]. Die vier in Kanada lebenden Patienten stammten ursprünglich aus der indischen Provinz Punjab, einer Region mit einer der höchsten HCV-Prävalenzraten Indiens [83].

In einer von „Gilead Science“ veröffentlichten Studie [84], wurden in einer Kohorte von über 14,000 HCV-infizierten Patienten 19 bisher nicht zugeordnete Subtypen identifiziert. Diese neuen Subtypen wurden bei in Frankreich lebenden Männern mit afrikanischem Migrationshintergrund und HCV-Genotyp 2-Infektion identifiziert.

Das Auftreten von neuen Geno- und Subtypen in Regionen, wie Genotyp 8 aus Indien in Kanada oder den unbekanntem Genotyp 2-Subtypen aus afrikanischen Endemiegebieten in Frankreich, verdeutlicht, den großen Einfluss, den die globale Mobilität der menschlichen Bevölkerung auf die genetische und epidemiologische Charakterisierung der HCV-Epidemiologie hat. [10, 25, 83].

Insbesondere in ressourceneingeschränkten Ländern, denen umfangreiche HCV-Identifikations- und Behandlungsstrategien und eine Auswahl an DAA-Regimes nicht zur Verfügung stehen, ist eine pan-genotypische Diagnostikmethode von großer Relevanz. Insbesondere um durch eine, vor Therapie durchgeführten, Genotypisierung Genotyp-Fehlidentifikationen zu vermeiden und um mögliche Resistenzen sowie unbekanntem Subtypen zu identifizieren [83].

Rückblickend betrachtet wäre es bei der Etablierung der vorliegenden Diagnostikmethode wünschenswert gewesen, Zugriff auf eine größere Zahl von bei

uns seltenen Genotypen zu haben. Insbesondere, um eine fundierte Aussage zur Funktionalität und Amplifikationseffizienz des Protokolls in Bezug auf die neuen HCV-Genotypen 7 und 8, sowie deren Subtypen machen zu können. Dies gilt analog ebenfalls für die im hiesigen Breitengrad seltenen Genotypen 5 und 6 und deren Subtypen [10].

In einer weiteren Studie sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die etablierte Universalprimer-Kombination auf die Subtypen von Genotypen 5 und 6 anwendbar ist oder ob initial, wie bei Genotyp 2, Primer-Anpassungen erforderlich sind (siehe 4.12). Die Bindungsstellen des pan-genotypischen-Primer zwischen den verschiedenen Geno- und Subtypen sind jedoch hoch konserviert, so dass von einer hohen Kompatibilität und Amplifikationsrate ausgegangen werden kann [1].

5.3 Einfluss von Resistenz-assoziierten Substitutionen (RAS) auf den Therapieerfolg von Hepatitis C

Das Auftreten von Resistenz-assoziierten Substitutionen (RAS) wurde im Verlauf mit einer eingeschränkten Wirksamkeit der DAA-Therapien und einem erhöhten Risiko für Therapieversagen in Verbindung gebracht [31, 47, 63]. Bei der Mehrheit der Patienten, welche mit NS5A-Inhibitoren behandelt wurden und bei denen ein Therapieversagen auftrat, wurden RAS in NS5A selektiert [85, 86]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass RAS über einen längeren Zeitraum bestehen können und höchstwahrscheinlich das anhaltende virologische Ansprechen (sustained virological response, SVR) bei erneuter Therapie negativ beeinflussen [31, 87, 88]. Dennoch ist die klinische Relevanz von Resistenzmutationen für die Behandlung des HCV-Genotyps mit DAA's noch unklar. Obwohl Resistenzen oft in Behandlungen bei Patienten ohne vorherige Therapie nachgewiesen werden können, finden aktuell keine routinemäßigen Resistenztestungen bei Patienten statt [1, 49].

In dieser Studie wurden daher ausschließlich RAS von Sequenzen analysiert, die mit dem hier vorliegenden pan-genotypischen Protokoll amplifiziert wurden (siehe Kapitel 4.13). Die Prävalenz der Baseline-RAS (Resistenzen vor Therapiestart) ist in dieser Kohorte mit insgesamt 8,9% niedriger als in vergleichbaren Studien gewesen [1, 31, 89, 90]. Das erhöhte Auftreten von RAS in Genotyp 3 entsprach den Resultaten einer früheren Studie derselben Forschungsgruppe [1, 91]. Am häufigsten wurden Polymorphismen in Genotyp 1b gefunden, bei denen die Aminosäure Tyrosin zu

Histidin an der Position 93 allein oder in Kombination mit anderen Polymorphismen an Position 31 vorherrschend aufgetreten ist [1].

Ob Resistenztestungen vor Beginn einer Therapie mit dem Ziel, Therapieentscheidungen zu optimieren, durchgeführt werden sollten, wurde zum Zeitpunkt der Datenerhebung 2017 kontrovers diskutiert [49].

Einerseits wird argumentiert, dass eine RAS-Basistestung selbst für spezifische Risikogruppen in Hinblick auf einen Therapieerfolg nicht notwendig sei, da die Gesamtzahl der Patienten mit RAS-Basistest und Therapieversagen einen relativ geringen Prozentsatz der Gesamtbevölkerung ausmacht. Des Weiteren scheinen RAS-Basiswerte bei den Genotypen 1b, 2, 4 und 6 keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg zu haben, sodass eine Testung hier nicht gerechtfertigt sei. Eine Testung sei zudem mit einem Herausögern der Behandlung und mit zusätzlichen Kosten verbunden. Unterschiedliche und international nicht genormte Berichte bergen ebenfalls Argumente für den Verzicht auf eine Resistenztestung [92].

Im Einklang mit anderen Studien werden Resistenztestungen allerdings als klinische Notwendigkeit betrachtet [49, 63]. Obwohl mit den eingeführten DAA-Kombinationen für die verschiedenen Genotypen beeindruckende SVR-Raten von nahezu 100% erreicht werden, gibt es eine geringe Anzahl an Therapieversagen, bei denen RAS nachgewiesen werden konnte [50]. Dies gilt auch für Patienten, die unter Therapie einen viralen Durchbruch erleben, wie auch für Patienten, die im Therapieprozedere keine nachweisbare HCV-RNA zeigen, jedoch nach Absetzen der Therapie einen viralen Rückfall erleiden [93]. Dies lässt sich als Indiz deuten, dass selbst ohne nachweisbare HCV-RNA im peripheren Blut eine fortlaufende HCV-Replikation unterhalb der Nachweisgrenze stattfindet und ein mögliches Risiko einer Resistenzselektion birgt [49]. Darüber hinaus können Baseline-NS5A-RASs die Effektivität von NS5A-Inhibitoren, basierend auf intrinsischen Eigenschaften, der RASs das pharmakologische Wirkprofil oder Interaktionen mit anderen Substanzen innerhalb des HCV-Behandlungsregimes, negativ beeinflussen. Dies stellt eine potentielle Gefährdung des Therapieerfolges dar, welche durch die simple Anwendung einer Resistenztestung umgangen werden könnte [63].

Die Entscheidung zur Durchführung von RAS-Testungen sollte auf der Grundlage des Ausmaßes des Effekts der Resistenzen auf das Behandlungsergebnis getroffen werden. Der Effekt von NS5A-spezifischen RAS ist bei bereits vorbehandelten Patienten oder Patienten mit Vorerkrankungen, wie Fibrose oder Zirrhose der Leber,

am größten [63]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Resistenzen an der Y93H-Substitution bei Patienten mit Zirrhose vermehrt nachweisbar waren. Dementsprechend war auch die SVR-Rate bei Patienten mit dieser Substitution signifikant niedriger im Vergleich zu Patienten, die keine Mutation an dieser Position besaßen [49]. In diesen Fällen wären Resistenztestungen vor Therapiebeginn zur Vorhersage des Behandlungserfolges sehr hilfreich und von klinischem Nutzen [49]. Während der Fertigstellung dieser Studie haben sich die Resistenzbarrieren der DAA-Kombinationen in der laufenden Entwicklungsphase derartig verbessert, dass es möglich sein wird, in Zukunft auf Resistenztestungen zu verzichten [92]. Selbst die EASL (European Association for the Study of the Liver) spricht sich mittlerweile gegen eine einheitliche RAS-Resistenztestung aus [27, 49].

5.4 Genotypisierung durch NS5A und Analyse mit Geno2pheno [HCV]

In der herkömmlichen Diagnostik wird die direkte Sequenzierung und Phylogenie-Interferenz der HCV-Core-Region für die Identifizierung von Genotypen und insbesondere für Subtypen als Goldstandard betrachtet (siehe Abbildung 5) [94]. Für die Identifizierung von HCV-Rekombinanten ist eine alleinige Sequenzierung der Core-Region nicht ausreichend, dies könnte nur durch eine Typisierung des gesamten HCV-Genoms erreicht werden [15, 79, 94-96].

In dieser Studie wurde eine Diagnostikmethode etabliert, die zur Genotypisierung die NS5A-Region und nicht die Core-Region verwendet hat (siehe Abbildung 6). Durch eine hohe Übereinstimmung der NS5A-Genotypisierung mit der Core-Genotypisierung konnte im Rahmen dieser Studie belegt werden, dass die Nutzung der NS5A-Genotypisierung als sehr zuverlässig anzusehen ist (siehe 4.15.2) [1].

In anderen Studien konnte ebenfalls bestätigt werden, dass neben der Core-Region auch andere HCV-Genomabschnitte) für eine effiziente Sequenzierung benutzt werden können [74, 94]. Von Andre-Garnier wurden NS4B-NS5A-Sequenzen mit den Sequenzen eines NS3-Amplifikationsprotokolls verglichen und zeigten, dass identische Ergebnisse erzielt wurden. Ebenso wurde in einer phylogenetischen Auswertung eine Konkordanz der Geno- und Subtypen von >95% nachgewiesen [74, 97]. Bei der Auswertung der hiesigen Daten fiel auf, dass Proben mit unterschiedlichen Subtypen in Core / NS5A allesamt zu seltenen oder nicht bestimmbar Subtypen gehörten (siehe 4.15.2, Tabelle 8). Hierzu gab es allerdings wenig Daten in den Sequenzbanken. Es besteht folglich die Möglichkeit,

dass es sich bei diesen Proben eher um ungenaue Genotyp-Bestimmungen als um echte Diskrepanzen handelt [1].

Die Genotyp-Prädiktion mit Geno2pheno_[HCV] war ebenfalls hochspezifisch. Das Interpretationssystem hat den Vorteil, dass die Auswertung schnell und benutzerfreundlich stattfindet und eine gleichzeitige Bestimmung von RAS möglich ist [70]. Nicht nur wurden HCV-Rekombinanten korrekt identifiziert, sondern für seltene Subtypen konnten bereits geringe Abweichungen in den Sequenzidentitäten zur den Referenzsequenzen von Diskrepanzen festgestellt werden.

Somit lässt sich festhalten, dass die Genotypisierung durch NS5A hoch präzise ist und den zusätzlichen Vorteil hat, rekombinante virale Varianten in der relevanten DAA-Zielregion korrekt vorher zu sagen [1].

5.5 Methodenvergleich

Parallel zur Entwicklung des hier vorliegenden Zwei-Schritt PCR-Protokolls mit dem Ziel, eine unabhängige Amplifikation der Hepatitis C Virus NS5A-Region zur simultanen Genotypisierung und Resistenztestung zu etablieren, wurde von der französischen Forschungsgruppe um Andre-Garnier ein pan-genotypischer Ansatz zur NS5A-Genotypisierung veröffentlicht [74]. Die Publikation wurde mit dem entwickelten Protokoll verglichen.

Bei dem Protokoll von Andre-Garnier handelt es sich um ein Ein-Schritt-PCR-Protokoll mit leicht unterschiedlichen Primerbindungsstellen. Es beschränkt sich zudem auf die Testung der Genotypen 1-5 [74]. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung 2017 waren die Genotypen 6 und 7 bereits identifiziert und bekannt. Diese wurden von Andre-Garnier jedoch nicht berücksichtigt.

Beide Protokolle zeigten vergleichbare Ergebnisse für Proben mit einer hohen Viruslast. Für eine vermeintlich effiziente Vervielfältigung von Proben mit niedrigen Viruskonzentrationen wurde im Ein-Schritt-Protokoll, für die RT-Reaktion das teurere T4-Gen32 (NewEngland BioLabs, USA) verwendet. Dennoch wurden bei mittleren bis niedrigeren Viruskonzentrationen lediglich geringe Mengen an PCR-Produkten amplifiziert. Die generierte Menge an Amplifikat war jedoch für die folgende Sequenzierung oftmals insuffizient. Folglich eignet sich das Protokoll von Andre-Garnier für Proben mit einer geringen Viruslast nur bedingt [1].

Im Gegensatz dazu ließ sich mit dem hier etablierten Zwei-Schritt-PCR-Protokoll die RNA mit dem kostengünstigeren Superscript III (Invitrogen, USA) revers-transkribieren und eine erfolgreiche Sequenzierung durchführen [62].

Es wird daher konstatiert, dass das Düsseldorfer Protokoll nicht nur günstiger, sondern auch effektiver als das französische Protokoll ist, insbesondere bei niedrigeren Viruslasten (<10.000 IU / ml), da es eine höhere Sensibilität aufweist (siehe Abbildung 23).

6 Schlussfolgerung

Kürzlich verkündete die Weltgesundheitsorganisation das Ziel, durch eine Reduzierung der Neuinfektionen um 90% und der Mortalität um 65% bis zum Jahr 2030, Hepatitis C global eliminieren zu wollen [5]. Dieses ambitionierte Vorhaben wird durch die Entwicklung von DAA's und deren großen Fortschritte in der HCV-Therapie unterstützt[98].

Bei der Realisierung dieser Ziele sind wichtige klinische und gesundheitspolitische Herausforderungen zu berücksichtigen: Leberzellkarzinome trotz Heilung [99], Medikamenteninteraktionen [98], Therapie im fortgeschrittenen Hepatitis-Stadium, beschränkter Zugang zu Diagnostik und Therapie in Entwicklungs- und Schwellenländern, Therapierückfälle, frühzeitige Diagnose bei noch asymptomatischen Infektionen sowie Reinfektionen [26, 46, 100]. Dies spricht dafür, dass eine globale Viruseliminierung allein mit dem jetzigen Standard der Diagnose und Therapie äußerst ambitioniert sein wird [100].

Die Kenntnisse über das Virus sind, in zeitlicher Relation gesehen, noch sehr jung, zudem könnte es insbesondere auf Resistenzen bezogen, zukünftig unerwartete Virusreaktionen geben, welche die bisherigen Behandlungserfolge zunichtemachen (siehe hierzu Studien [101, 102]). Weiterhin scheint das Interesse seitens der Pharmaindustrie an der Entwicklung eines prophylaktischen Impfstoffes sowie an der Ausweitung des jetzigen Therapieregimes gering zu sein [26, 100]. Folglich ist es daher umso wichtiger, aktuelle Diagnostikmethoden konstant zu optimieren [6, 32].

Mit diesem Protokoll ist es gelungen, trotz einer enormen HCV-Sequenzdiversität zwischen Geno- und Subtypen, einen PCR-Ansatz zu entwickeln, welcher effizient und erfolgreich alle Geno- und Subtypen aus infizierten Patientenproben mit niedrigen viralen HCV-RNA-Konzentrationen amplifiziert [1].

Dieser Ansatz ermöglicht nicht nur eine Genotypisierung, sondern auch eine simultane Resistenztestung in der wichtigsten RAS-Region NS5A [1].

Darüber hinaus erhält der Anwender Informationen zu Baseline-Resistenz-assoziierte Substitutionen, vor allem auch bei Patienten, die initial vor Therapiebeginn nicht auf Resistenzen hin untersucht worden wären.

Das vorliegende pan-genotypische NS5A-PCR-Protokoll stellt eine erhebliche Verbesserung der derzeit verfügbaren Diagnostikmethoden dar. Zusätzlich birgt die

neu etablierte Methode den Vorteil, bisherige Kosten und vor allem Zeit in der Diagnostik um 50% zu reduzieren [1].

Somit konnte erfolgreich eine Genotyp-unabhängige Amplifikation der Hepatitis C Virus NS5A-Region zur simultanen Genotypisierung und Resistenztestung als neue Standarddiagnostikmethode im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliert werden.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Strukturübersicht des HCV Genoms	3
Abbildung 2: Übersicht globale Genotyp Verteilung von HCV	6
Abbildung 3: Historische Erfolge in der HCV-Therapie	8
Abbildung 4: Übersicht des HCV-Genoms	15
Abbildung 5: Übersicht der bisherigen Arbeitsschritte für die HCV-Genotypisierung in der Routinediagnostik an dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf	16
Abbildung 6: Übersicht der neu eingeführten Arbeitsschritte für eine pan- genotypische Amplifikation zur simultanen Genotypisierung und Resistenztestung der HCV-NS5A-Region an dem Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf	16
Abbildung 7: Übersicht des pan-genotypischen NS5A Ansatzes	31
Abbildung 8: Erster Amplifikationsversuch der NS5A-Region mittels nested-PCR fehlgeschlagen.....	32
Abbildung 9: Testung der neu designten Primer in Kombination mit dem etablierten HCV-Universalprimer.....	34
Abbildung 10: Testung der Funktionsfähigkeit der etablierten Primer durch die Amplifikation von PCR1	35
Abbildung 11: Testung der Funktionsfähigkeit von universellen Primerkombinationen	36
Abbildung 12: Testung zur Funktionalität des universal Primers durch Amplifikation von Genotyp 1a mit cDNA als Template.....	37
Abbildung 13: Testung verschiedener Polymerasen zur optimierten Amplifikation des PCR-Produkts	39
Abbildung 14: Testung der neu entwickelten Reverseprimer 6852-R für PCR2	41
Abbildung 15: Testung der Funktionsfähigkeit des etablierten Primerprotokolls bei der Amplifikation weiterer Genotypen	43
Abbildung 16: Testung der Wirksamkeit des etablierten Primerprotokolls bei der Amplifikation von Genotypen mit diversen Viruslasten	44
Abbildung 17: Testung der Amplifikation von Genotyp 4d mit dem neu etablierten Primer-Protokoll	45

Abbildung 18: Testung der Amplifikation verschiedener Genotyp-2-Proben für den Vergleich der Effizienz des optimierten Primer-Protokolls	46
Abbildung 19: Optimierung der Bindekapazität der Primer 6217-F GT2 und 6922-R GT2	47
Abbildung 20: Testung der Amplifikationseffizienz mit dem optimiertem Primer-Protokoll für Genotyp 2.....	48
Abbildung 21: Testung der Amplifikation der Genotypen 1-6 mit der neu modifizierten Primer-Kombination.....	49
Abbildung 22: Phylogentische Sequenzanalyse von NS5A-Amplikons	53
Abbildung 23: Direkter Vergleich der Wirksamkeit der unterschiedlichen NS5A-Amplifikations Protokolle	55

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der aktuellen Therapie Empfehlungen für HCV-Monoinfizierte Patienten mit und ohne kompensierte Zirrhose (Therapiedauer in Wochen).....	10
Tabelle 2: Übersicht der Oligonukleotide.....	21
Tabelle 3: RT-Protokoll.....	24
Tabelle 4: Nested-PCR-Protokoll.....	26
Tabelle 5: Übersicht der Primer-Kombination.....	33
Tabelle 6: Ambiguity Code	40
Tabelle 7: Übersicht der Genotyp Verteilung der Patientenproben	50
Tabelle 8: Unterschiede der Sequenzanalyse in der jeweiligen HCV-Sequenzierung mit Core, NS5A und Geno2Pheno _[HCV]	52
Tabelle 9: NS5A-Resistenz-assoziierte Substitutionen (RAS) innerhalb der Kohorte	54
Tabelle 10: Vergleich der verschiedenen pan-genotypischen Ansätze für die NS5A-Amplifikation.....	56

9 Literaturverzeichnis

1. Walker, A., et al., *A pan-genotypic Hepatitis C Virus NS5A amplification method for reliable genotyping and resistance testing*. J Clin Virol, 2019. **113**: p. 8-13.
2. Feinstone, S.M., et al., *Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B*. New England Journal of Medicine, 1975. **292**(15): p. 767-770.
3. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
4. WHO. *Hepatitis C in the WHO European Region, Fact sheet 2019*. 2019.
5. WHO. *Combating Hepatitis B and C to reach Elimination by 2030*. [Advocacy brief] 2016; Available from: <https://www.who.int/hepatitis/publications/hep-elimination-by-2030-brief/en/>
6. Bartenschlager, R., S. Urban, and U. Protzer, *Towards curative therapy of chronic viral hepatitis*. Z Gastroenterol, 2019. **57**(1): p. 61-73.
7. DGVS. *S3-Leitlinie "Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektion"*. 2018; AWMF-Register-No.:021/012].
8. Kartashev, V., et al., *New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions*. J Clin Virol, 2016. **81**: p. 82-9.
9. RKI. *Hepatitis C, Robert Koch Institut-Ratgeber*. 2018 31.01.2018 [cited 2018 25.09.].
10. Messina, J.P., et al., *Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2015. **61**(1): p. 77-87.
11. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 558-67.
12. 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.
13. 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.
14. Lohmann, V. and R. Bartenschlager, *On the history of hepatitis C virus cell culture systems*. J Med Chem, 2014. **57**(5): p. 1627-42.

15. Nakano, T., et al., *An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region*. Liver Int, 2012. **32**(2): p. 339-45.
16. Smith, D.B., et al., *The origin of hepatitis C virus genotypes*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 2)**: p. 321-8.
17. 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.
18. Murphy, D.G., et al., *Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(3): p. 967-72.
19. Major, M.E., et al., *Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3317-25.
20. Neumann, A.U., et al., *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy*. Science, 1998. **282**(5386): p. 103-7.
21. Martell, M., et al., *Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 3225-9.
22. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
23. Magiorkinis, G., et al., *The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis*. PLoS Med, 2009. **6**(12): p. e1000198.
24. Walker, A., et al., *Natural prevalence of resistance-associated variants in hepatitis C virus NS5A in genotype 3a-infected people who inject drugs in Germany*. J Clin Virol, 2015. **70**: p. 43-5.
25. Markov, P.V., et al., *Colonial history and contemporary transmission shape the genetic diversity of hepatitis C virus genotype 2 in Amsterdam*. J Virol, 2012. **86**(14): p. 7677-87.
26. Lohmann, V., *Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development*. Med Microbiol Immunol, 2018.

27. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e. and L. European Association for the Study of the, *EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018*. J Hepatol, 2018. **69**(2): p. 461-511.
28. Hoofnagle, J.H., et al., *Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report*. N Engl J Med, 1986. **315**(25): p. 1575-8.
29. Poynard, T., et al., *Viral hepatitis C*. Lancet, 2003. **362**(9401): p. 2095-100.
30. Rice, C.M. and M. Saeed, *Hepatitis C: Treatment triumphs*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 43-4.
31. Sarrazin, C., *The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice*. J Hepatol, 2016. **64**(2): p. 486-504.
32. Boettler, T., V. Lohmann, and R. Bartenschlager, [*Hepatitis C: From Individual Cure to Worldwide Elimination?*]. Dtsch Med Wochenschr, 2019. **144**(8): p. 535-542.
33. Lohmann, V., et al., *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-3.
34. Schaefer, E.A. and R.T. Chung, *Anti-hepatitis C virus drugs in development*. Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1340-1350 e1.
35. Chung, R.T. and T.F. Baumert, *Curing chronic hepatitis C--the arc of a medical triumph*. N Engl J Med, 2014. **370**(17): p. 1576-8.
36. Lamarre, D., et al., *An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 186-9.
37. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e., et al., *EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series()*. J Hepatol, 2020. **73**(5): p. 1170-1218.
38. Agency, E.M., *Epclusa: EPAR - Product Information 28/07/2016*.
39. Agency, E.M., *Harvoni, EPAR - Product Information*. 2016.
40. Agency, E.M., *Vosevi, EPAR - Product Information*. 22/09/2017.
41. Sandmann, L., et al., *Treatment of Chronic Hepatitis C: Efficacy, Side Effects and Complications*. Visc Med, 2019. **35**(3): p. 161-170.
42. Benzine, T., et al., *NS5A inhibitors unmask differences in functional replicase complex half-life between different hepatitis C virus strains*. PLoS Pathog, 2017. **13**(6): p. e1006343.

43. Afdhal, N., et al., *Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2014. **370**(16): p. 1483-93.
44. Gilead. *Gilead Sciences - Sovaldi Gebrauchsanweisung*. 2018; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sovaldi-epar-product-information_en.pdf
45. Pockros, P.J., et al., *Efficacy of Direct-Acting Antiviral Combination for Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection and Severe Renal Impairment or End-Stage Renal Disease*. Gastroenterology, 2016. **150**(7): p. 1590-1598.
46. Vermehren, J., et al., *Challenges and perspectives of direct antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2018. **69**(5): p. 1178-1187.
47. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens*. Gastroenterology, 2016. **151**(1): p. 70-86.
48. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C virus population dynamics during infection*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **299**: p. 261-84.
49. Walker, A., et al., *Genotypic resistance testing of HCV - is there a clinical need?* GMS Infect Dis, 2016. **4**: p. Doc05.
50. Lontok, E., et al., *Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary*. Hepatology, 2015. **62**(5): p. 1623-32.
51. Cento, V., et al., *HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39652.
52. Sullivan, J.C., et al., *Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(2): p. 221-9.
53. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1972-4.
54. Bartenschlager, R., *Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(11): p. 911-6.
55. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
56. Gao, M., et al., *Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect*. Nature, 2010. **465**(7294): p. 96-100.

57. McGivern, D.R., et al., *Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 453-62 e7.
58. Berger, C., et al., *Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication*. Gastroenterology, 2014. **147**(5): p. 1094-105 e25.
59. Di Maio, V.C., et al., *Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies*. Liver Int, 2017. **37**(4): p. 514-528.
60. Sharp, M. and D. B.V., *Zepatier: EPAR - Product Information*. 2018. **2016**(28/07): p. Product Information.
61. Walker, A., *Therapie der Hepatitis C - Spielen Resistenzen eine Rolle?* 2016.
62. 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.
63. Zeuzem, S., et al., *NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome*. J Hepatol, 2017. **66**(5): p. 910-918.
64. Papatheodoridis, G.V., et al., *Hepatitis C: The beginning of the end-key elements for successful European and national strategies to eliminate HCV in Europe*. J Viral Hepat, 2018. **25 Suppl 1**: p. 6-17.
65. Bartlett, S.R., et al., *Sequencing of hepatitis C virus for detection of resistance to direct-acting antiviral therapy: A systematic review*. Hepatol Commun, 2017. **1**(5): p. 379-390.
66. Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., and Gerard, G.F., *Gene* 35, 249. 1985.
67. Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., and Noon, M.C., *DNA* 5, 271. 1986.
68. Doerr; Hans W., G.W.H., *Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2002. 737.
69. Scientific, T., *NanoDrop 2000/2000 c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. 2009.

70. 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.
71. Letunic, I. and P. Bork, *Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation*. Bioinformatics, 2007. **23**(1): p. 127-8.
72. Yusim, K., et al., *Los alamos hepatitis C immunology database*. Appl Bioinformatics, 2005. **4**(4): p. 217-25.
73. Viazov, S., et al., *Hepatitis C virus recombinants are rare even among intravenous drug users*. J Med Virol, 2010. **82**(2): p. 232-8.
74. Andre-Garnier, E., et al., *An NS5A single optimized method to determine genotype, subtype and resistance profiles of Hepatitis C strains*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0179562.
75. Knittel, T. and D. Picard, *PCR with degenerate primers containing deoxyinosine fails with Pfu DNA polymerase*. PCR Methods Appl, 1993. **2**(4): p. 346-7.
76. TaKaRa, *TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase Hot-Start Version User Manuals*. 2017.
77. N., G., *Biowissenschaftlich recherchieren*. 2007, Birkhäuser Basel. p. 195.
78. Letunic, I. and P. Bork, *Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees*. Nucleic Acids Research, 2016: p. W242-W245.
79. Kalinina, O., et al., *A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4034-43.
80. Welzel, T.M., et al., *Daclatasvir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, achieved high sustained virological response rates in patients with HCV infection and advanced liver disease in a real-world cohort*. Gut, 2016. **65**(11): p. 1861-1870.
81. Sarrazin, C., et al., *Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region*. Antiviral Res, 2015. **116**: p. 10-6.
82. Gottwein, J.M., et al., *Efficacy of NS5A Inhibitors Against Hepatitis C Virus Genotypes 1-7 and Escape Variants*. Gastroenterology, 2018. **154**(5): p. 1435-1448.

83. Borgia, S.M., et al., *Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes*. J Infect Dis, 2018. **218**(11): p. 1722-1729.
84. Hedskog, C., et al., *Identification of 19 Novel Hepatitis C Virus Subtypes- Further Expanding HCV Classification*. Open Forum Infect Dis, 2019. **6**(3): p. ofz076.
85. Viazov, S., et al., *Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay*. J Virol Methods, 1994. **48**(1): p. 81-91.
86. Wyles, D., et al., *Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir*. J Hepatol, 2017. **66**(4): p. 703-710.
87. Jiang, M., et al., *In vitro phenotypic characterization of hepatitis C virus NS3 protease variants observed in clinical studies of telaprevir*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(12): p. 6236-45.
88. McPhee, F., et al., *Preclinical Profile and Characterization of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (BMS-650032)*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(10): p. 5387-96.
89. Palanisamy, N., et al., *Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals*. Antivir Ther, 2018. **23**(6): p. 485-493.
90. Hirotsu, Y., et al., *HCV NS5A resistance-associated variants in a group of real-world Japanese patients chronically infected with HCV genotype 1b*. Hepatology International, 2015. **9**(3): p. 424-430.
91. Walker, A., et al., *Natural prevalence of resistance-associated variants in hepatitis C virus NS5A in genotype 3a-infected people who inject drugs in Germany*. J Clin Virol, 2015. **70**: p. 43-45.
92. Feld, J.J., *Resistance testing: Interpretation and incorporation into HCV treatment algorithms*. Clin Liver Dis (Hoboken), 2017. **9**(5): p. 115-120.
93. Herzer, K., et al., *Management of telaprevir-based triple therapy for hepatitis C virus recurrence post liver transplant*. World J Hepatol, 2015. **7**(9): p. 1287-96.
94. Mansoor, S., et al., *Heterogeneous genomic locations within NS3, NS4A and NS4B identified for genotyping and subtyping of Hepatitis C virus: A simple genome analysis approach*. Infect Genet Evol, 2016. **44**: p. 61-68.

95. Kurbanov, F., et al., *Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan*. Hepatol Res, 2008. **38**(5): p. 457-64.
96. Kurbanov, F., et al., *Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1_2k/1b*. J Infect Dis, 2008. **198**(10): p. 1448-56.
97. 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.
98. Schulte, B., et al., *Frequency of Potential Drug-Drug Interactions in the Changing Field of HCV Therapy*. Open Forum Infect Dis, 2020. **7**(2): p. ofaa040.
99. Guarino, M., et al., *Recurrence of hepatocellular carcinoma after direct acting antiviral treatment for hepatitis C virus infection: Literature review and risk analysis*. Dig Liver Dis, 2018. **50**(11): p. 1105-1114.
100. Bartenschlager, R., et al., *Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies*. Virus Res, 2018. **248**: p. 53-62.
101. Pham, L.V., et al., *HCV Genotype 6a Escape From and Resistance to Velpatasvir, Pibrentasvir, and Sofosbuvir in Robust Infectious Cell Culture Models*. Gastroenterology, 2018. **154**(8): p. 2194-2208 e12.
102. Newsum, A.M., et al., *Persistence of NS5B-S282T, a sofosbuvir resistance-associated substitution, in a HIV/HCV-coinfected MSM with risk of onward transmission*. J Hepatol, 2018. **69**(4): p. 968-970.

10 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich nachstehenden Personen aussprechen, ohne die die vorliegende Promotionsschrift nicht zu Stande gekommen wäre:

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. med. Jörg Timm**, der es mir ermöglichte im Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf zusammen mit einer sehr freundlichen und herzlichen Arbeitsgruppe meine Dissertationsarbeit schreiben zu dürfen. Ebenso danken möchte ich für Inspirationen und Anregungen, für den persönlichen Werdegang als angehende Ärztin, die über den Laboralltag hinausgehen.

Meinem Betreuer **Dr. Andreas Walker** für die wohlwollende und engagierte Betreuung des Projekts. Seine persönliche Art war für mich ausschlaggebend diese Dissertationsarbeit durchzuführen. Von Beginn an wurde mir von ihm Sicherheit und Vertrauen entgegengebracht, was konstant über den Arbeitsprozess auch mit einer Portion Humor aufrechterhalten wurde. Es war eine große Stütze, sich stets auf eine offene Tür und Ohr verlassen zu dürfen.

Frau **Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino** für ihre Zeit in der Begutachtung meiner Dissertationsarbeit.

Frau **Dr. Nadine Lübke**, für all die Bemühungen, auch zu ungünstigen Zeitpunkten zwischen Telefonaten, mir bei Fragen jeglicher Art zur Seite zu stehen und für die motivierenden Hilfestellungen, um im Laboralltag weiter zu kommen.

Frau **Dr. Christine Cosmovici** für den Ersatz von Google, all den lehrreichen, interessanten und auch amüsanten Gesprächen im gemeinsamen Schreibraum.

Der „AG Timm“, insbesondere **Wiebke Moskorz, Ramona Grothmann, Christopher Menne, Dr. Tina Senff, Tatjana Schwarz, Eugen Bäcker** und **Alexandra Graupner**, für die liebevolle Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft, die zahlreichen unterhaltsamen Mittagessen, Geburtstage, Hochzeiten und Kuchen **Meiner Familie**, die meinen bisherigen Werdegang stets interessiert begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen sowie, basierend auf den eigenen Lebenserfahrungen, stets versuchten, mir den für mich bestmöglichen Weg zu weisen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Virologie am Universitätsklinikum Düsseldorf für eine angenehme Zusammenarbeit und schöne Zeit.