

Aus der Medizinischen Klinik I des
Zentrums für Innere Medizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. H. Greten

Die Quantifizierung von cccDNA bei Patienten mit chronischer Hepatitis B-
Virusinfektion unter antiviraler Therapie und Korrelation zu serologischen und
histologischen Parametern

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Frauke Metzler
aus Aurich/Ostfriesland

Hamburg 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2. Einleitung	5
2.1. Die Hepatitis B Virus Infektion	5
2.2. Hepatitis B Viruspartikel und die HBV Replikation	6
2.3. Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion	10
2.3.1. Interferon alpha	10
2.3.2. Lamivudin	11
2.3.3. Adefovirdipivoxil	11
2.4. cccDNA und antivirale Therapie	12
2.5. Die Bedeutung der cccDNA und ihre quantitative Bestimmung	13
3. Materialien und Methoden	17
3.1. Materialien	17
3.1.1. Substanzen	17
3.1.2. Werkstoffe und Geräte	20
3.2. Studiendesign	22
3.2.1. Einschlusskriterien	22
3.2.2. Ausschlusskriterien	22
3.2.3. Studienverlauf	23
3.2.4. Endpunkte der Studie	24
3.2.5. Patienten	24
3.2.6. Ethikkommission Hamburg	24
3.3. Methoden	25
3.3.1. Leberbiopsieentnahme	25
3.3.2. HBV DNA Extraktion aus humanem Lebergewebe	25
3.3.3. DNA Messung mit Eppendorf – Biophotometer	26
3.3.4. Herstellung der gebrauchsfertigen Proben	27
3.3.5. DNA-Verdau zur Verbesserung der cccDNA-Spezifität	27
3.3.6. DNA-Quantifizierung mit dem Light cycler System	28
3.3.7. Übersicht über die Methode der PCR-Amplifikation	30
3.3.8. Quantifizierung von cccDNA	30
3.4. HBsAg-Bestimmung aus asservierten Patientenserum	32
3.4.1. HBsAg-Bestimmung mit dem Testkit „Monolisa HBsAg Ultra“ ® von Bio-Rad	32
3.4.2. Serumproben-Verdünnungsreihe zur HBsAg-Quantifizierung	34
3.4.3. HBsAg-Standard-Verdünnungsreihe	34
3.4.4. Ermittlung einer HBsAg-Standardkurve	35
3.5. Histologische Beurteilung der Leberbiopsieproben	35
3.6. Berechnung des Upper Limit Normal- (ULN) Wertes des ALT-Wertes	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Biochemie, Serologie und Histologie	39
4.1.1. Biochemisches Therapieansprechen	39

4.1.2. Serologisches Therapieansprechen	40
4.1.3. Klinisch-virologisches Therapieansprechen	41
4.1.4. Histologisches Therapieansprechen	43
4.2. Experimentell ermittelte virologische Daten	46
4.2.1. Anzahl der cccDNA-Moleküle pro Leberzelle. Vergleich der ermittelten Daten aus den Leberbiopsien zu Woche 0 und Woche 48	46
4.2.2. Intrazelluläre HBV-DNA	48
4.2.3. HBsAg Bestimmung	49
4.2.3.1. Evaluation eines geeigneten HBsAg-Standards	49
4.2.3.2. Verdünnung des Patientenserums	52
4.2.3.3. Messung der Serum-HBsAg-Konzentrationen zu Woche 0 und Woche 48	56
5. Diskussion	58
5.1. Ziel der Arbeit	58
5.2. Quantifizierung der cccDNA pro Leberzelle	58
5.3. Intrinsische Stabilität der cccDNA	58
5.4. Kinetik der cccDNA-Reduktion	60
5.5. cccDNA und HBsAg	63
5.6. cccDNA und HBsAk	64
5.7. Mechanismen der cccDNA-Elimination	65
5.8. Intrazelluläre HBV-DNA	68
5.9. Serum-HBV-DNA, intrazelluläre HBV-DNA und cccDNA	70
5.10. Histologische Veränderungen	71
6. Zusammenfassung	73
7. Literaturverzeichnis	74
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	83
9. Anhang	84

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der intrazellulären covalently closed circular DNA (cccDNA), die das zentrale Molekül im Lebenszyklus des Hepatitis B Virus in Hepatozyten darstellt.

Bislang ist nur wenig über die intrinsische Stabilität und die Menge der cccDNA in den verschiedenen Stadien der chronischen HBV-Erkrankung und die Dynamik der cccDNA unter antiviraler Behandlung bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine 48-wöchige Behandlung mit dem Nukleotidanalogen Adefovirdipivoxil zu einem signifikanten Rückgang der cccDNA Menge führt (Werle-Lapostolle 2004). Weiterhin wurde beobachtet, dass das Hepatitis B surface Antigen (HBs-Ag) im Serum in Korrelation zur cccDNA reduziert werden konnte.

Bei Patienten, die in der Medizinischen Leberambulanz des UKE an einer Pilotstudie zur Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion mit einer 48-wöchigen Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon alpha und Adefovirdipivoxil teilnehmen, wurden jeweils vor Therapiebeginn und zum Therapieende Leberbiopsien entnommen und Serumproben asserviert.

Mit Hilfe eines kürzlich etablierten Echtzeit-PCR-Verfahrens wurde die cccDNA sowie die Gesamt HBV DNA aus den tiefgefrorenen Leberbiopsien quantifiziert und die Menge der Moleküle pro Leberzelle bestimmt. HBsAg im Serum wurde mittels eines ELISA quantifiziert.

Als Arbeitshypothese wurde eine der Monotherapie vergleichbare Reduktion der cccDNA unter antiviraler Kombinationstherapie postuliert.

Es wurde geprüft, wie sich die Menge der intrahepatozellulären cccDNA, der intrahepatozellulären Gesamt HBV DNA und des HBsAg im Serum unter Therapie verändern.

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der cccDNA und der Gesamt HBV DNA, der Menge der cccDNA und der Menge von HBsAg im Serum sowie der Anzahl der Gesamt HBV DNA und des HBsAg im Serum besteht.

2. Einleitung

2.1. Die Hepatitis B Virus Infektion

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Virus, das beim Menschen eine Leberentzündung hervorruft. Trotz der wirksamen Schutzimpfung stellt die Hepatitis B Virus-Infektion ein weitreichendes Gesundheitsproblem dar. Weltweit sind schätzungsweise 350-400 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis B Virus infiziert (Lee 1997). Zu den Komplikationen einer chronischen Hepatitis B-Infektion gehören die Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom (Lee 1997).

Übertragen wird das Virus durch Blut und Körperflüssigkeiten. Infektionen finden v. a. perinatal, durch sexuelle Kontakte, durch Übertragung von Blutprodukten sowie durch Nadelstichverletzungen und/oder bei sehr engem Personenkontakt durch offene Wunden statt (CDC 1985; CDC 1988; CDC 1991; Margolis et al. 1991). Es werden zwei Verlaufsformen der HBV-Infektion differenziert, die akute Hepatitis B Virus Infektion und die chronische Hepatitis B Infektion.

Die akute HBV-Infektion bleibt klinisch bei 60-80% der Infizierten unbemerkt, nur ca. 20-40% der Infizierten entwickeln Symptome, u. a. Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Oberbauchschmerzen und einen Ikterus von Haut und Skleren.

Ca. 90% der im Erwachsenenalter erworbenen Infektionen heilen spontan aus. Dies zeigt sich durch den Verlust des HBsAg im Serum und das Auftreten von Antikörpern gegen das HBsAg (anti-HBs). 10% der im Erwachsenenalter erworbenen Infektionen verlaufen chronisch, und die betroffenen Personen besitzen ein deutlich erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko.

2.2. Hepatitis B Viruspartikel und die HBV Replikation

Das humane Hepatitis B Virus ist ein DNA-Virus aus der Familie der Hepadnaviren (=Hepatotrope DNA Viren) mit komplexem Genomaufbau. Neben dem humanen HBV existieren noch weitere im Tierreich vorkommende Hepadnaviren wie das Virus

des Waldmurmeltiers (WHV = Woodchuck Hepatitis Virus) oder das bei Enten vorkommende Duck Hepatitis B Virus (DHBV).

Das kleine, etwa 3200 Basenpaare umfassende zirkuläre Genom des humanen Hepatitis B-Virus besteht aus vier überlappenden offenen Leserahmen (open reading frames – ORF) (Seeger et al. 2000). Der prä-S/S ORF ist unterteilt in eine prä-S1, prä-S2 und S Region, die für das große, mittlere und kleine Hüllprotein (envelope) kodieren und aus denen sich das HBs-Antigen zusammensetzt (Lau 1993) (Lok 2000). Das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) wird auch als kleines Hüllprotein bezeichnet. Es konnten verschiedene antigene Epitope (a, y, w, r) des HBsAg nachgewiesen werden, deren unterschiedliche Kombinationen eine Einteilung in Genotypen ermöglicht (Bancroft et al. 1972).

Die Oberflächenproteine sind wichtig für die Struktur des HBV. Das Prä-S1-Protein trägt zusätzlich an seinem Aminoterminus eine Bindungsstelle für den bislang unbekanntem hepatozellulären Rezeptor (Neurath 1986) und scheint deshalb wichtig für die Infektiosität des HBV zu sein (Bruss et al. 1991). Klinisch relevant ist v. a. das kleine Hüllprotein. Besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer Hepatitis B Infektion, wird im Serum der Patienten primär nach dem HBsAg gesucht.

Die Proteine des 27nm großen Nukleokapsids werden vom C-Gen kodiert. Das auf der Oberfläche des Nukleokapsids exprimierte Antigen ist das Hepatitis B core (=Kern) Antigen (HBcAg) und in der frühen Phase der Infektion nachweisbar (Galibert 1979).

Das dritte HBV-Antigen ist das HBeAg und wird ebenfalls vom C-Gen kodiert. Es unterscheidet sich immunologisch vom HBcAg und wird als lösliches Antigen nicht ins Nukleokapsid eingebaut (Miyanochara 1986).

Aufgrund von Mutationen in der Prä-Core- oder Promoter-Region kommen v. a. in Südeuropa, aber auch in Deutschland, immer häufiger HB-Viren vor, die kein HBeAg

bilden können (Buckwold et al. 1996; Scaglioni et al. 1997). Diese Virusvarianten besitzen vermutlich einen immunologischen Vorteil.

Das P-Protein, das die Funktion der DNA-abhängigen DNA-Polymerase sowie die Funktion der RNA-abhängigen reversen Transkriptase erfüllt, wird vom größten HBV-Gen kodiert. Die Polymerase hat einen großen ORF (ca. 800 Aminosäuren), der sich über die gesamte Länge des S-ORF hinwegspannt und aus drei funktionellen Domänen besteht: der terminalen Proteindomäne, der Domäne der Reversen Transkriptase und der Domäne der RNase H.

Das letzte HBV-Gen kodiert für das X-Protein, ein kleines, nicht strukturelles Protein, das transaktivierende Eigenschaften auf virale und zelluläre Gene besitzt. Es wird mit der zirrroseunabhängigen HCC-Entwicklung in Verbindung gebracht.

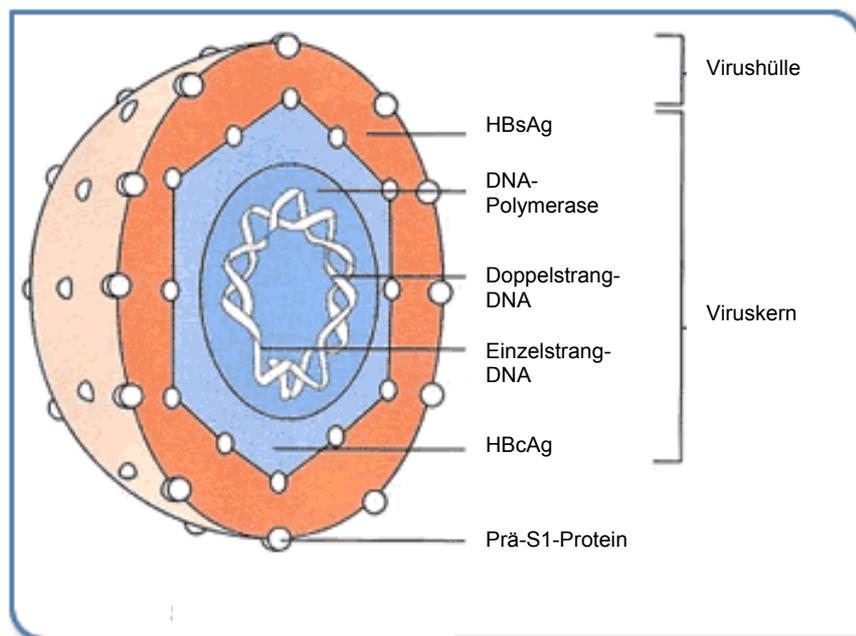


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Hepatitis B Virus Partikel. Von außen nach innen: Das Prä-S1-Protein ist das große Hüllprotein und sitzt in der Virushülle. Das HBsAg ist das kleine Hüllprotein. Es folgt der Viruskern mit dem HBeAg. In den Kern eingeschlossen die offen zirkuläre, zum Teil doppelsträngige HBV-DNA sowie die Polymerase, die auch die Funktion einer Reversen Transkriptase übernimmt.

Hepadnaviren bedienen sich einer außergewöhnlichen Vermehrungsstrategie. Nach der Infektion der Zelle wird das partiell doppelsträngige offene zirkuläre Genom zum Leberzellkern transportiert, wo es durch wirtseigene Enzyme in ein komplett doppelsträngiges zirkuläres Molekül umgewandelt wird. Aus dieser replikativen Form entsteht die covalently closed circular (kovalent geschlossene zirkuläre) DNA (cccDNA), die durch die Anlagerung an zelluläre Histone zu viralen Minichromosomen wird (Bock 1994) (Newbold et al. 1995). Die Hepatitis B Virus cccDNA verbleibt im Zellkern und dient als die transkriptionelle Matrize für die HBV RNA Produktion.

Mit der Herstellung zahlreicher Kopien einer terminal redundanten replikativen RNA, dem sogenannten Prägenom, setzt sich die virale Replikation fort. Die viralen mRNAs, die für das multifunktionale Polymerase Protein, das Core Protein und das Hüllprotein kodieren, werden zur Translation in das Zytoplasma transportiert. Die prägenomische RNA (pgRNA) wird im Zytoplasma durch die virale Polymerase in eine einzelsträngige Minus-DNA revers transkribiert (Summers 1982). Anschließend wird das Prägenom degradiert und die minus-Strang DNA dient als Vorlage für die Synthese einer Plus-Strang DNA unterschiedlicher Länge.

Ab diesem Zeitpunkt verläuft das Schicksal der neu entstandenen Nukleokapside in zwei Richtungen. Sie können sich entweder mit den Hüllproteinen zusammenlagern, Virionen produzieren und aus der Zelle sezerniert werden oder sie werden als Teil eines Regelkreislaufes, der den Pool der cccDNA Moleküle aufrechterhält, in den Nukleus zurückgeschleust (Tuttleman et al. 1986). Die Akkumulation der cccDNA im Zellkern wird durch virale Hüllproteine reguliert (Summers 1990; Moraleda et al. 1997). Die cccDNA Kopienzahl liegt in den infizierten humanen Zellen stabil bei etwa fünf bis 50 Molekülen (Miller et al. 1984; Tuttleman et al. 1986; Kajino et al. 1994).

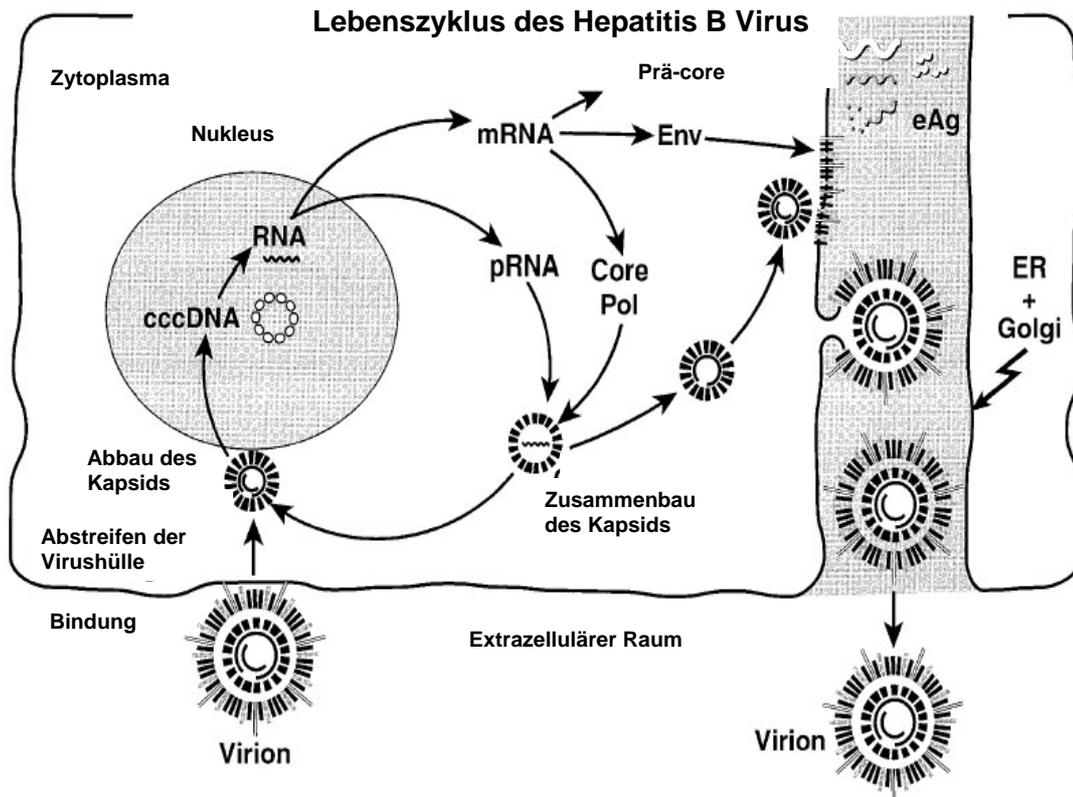


Abbildung 2: Darstellung des Infektions- und Reproduktionszyklus des Hepatitis B Virus. Das Virus (Virion) bindet an spezifische bislang unbekannte Rezeptoren der Leberzelle. Beim Eintreten in die Wirtszelle wird die Virushülle abgestreift. Der Virus Kern mit der Virus-DNA tritt in den Wirtszellkern ein. Dort findet die Umwandlung der offenen zirkulären DNA zur kovalent geschlossenen DNA (cccDNA) statt. Die cccDNA dient als Matrize für die HBV-Reproduktion. Es wird eine subgenomische RNA transkribiert, die als Schablone für eine Reverse Transkriptase zur Minusstrang-DNA dient. Mit Hilfe der Polymerase wird der Plusstrang synthetisiert. Die viralen Proteine werden mit Hilfe der subgenomischen RNA translatiert. Der größere Teil der neu produzierten HBV-DNA wird als neues Virion verpackt aus der Zelle geschleust, die andere Fraktion wird erneut in der Wirtszellkern transportiert und zu cccDNA umgewandelt.

2.3. Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion

Die chronische Hepatitis B-Infektion heilt spontan nur selten aus. Lediglich 0,5% der HBsAg-positiven Personen verlieren das HBsAg pro Jahr, die meisten von ihnen bilden anti-HBsAg-Antikörper aus (Liaw 1991; Adachi et al. 1992; McMahon et al. 2001).

Eine lang anhaltende Unterdrückung der HBV-Replikation und ein Rückgang der Leberentzündung in Verbindung mit einer Progressionsverzögerung sind die klinischen Ziele der Therapie der chronischen HBV-Infektion.

Für die Messung des Therapieerfolgs wurden Endpunkte festgelegt: Normalisierung der ALT (biochemisches Ansprechen), nicht messbare HBV-DNA im Serum (virologisches Ansprechen), Verlust des HBeAg mit oder ohne Auftreten von anti-HBe (serologisches Ansprechen) und Verbesserung der Leberhistologie (histologisches Ansprechen) (Lok et al. 2001).

Die folgenden Medikamente sind zur Behandlung der chronischen HBV-Infektion zum jetzigen Zeitpunkt in Deutschland zugelassen.

2.3.1. Interferon alpha

Alpha-Interferone (IFNs) haben antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Effekte. Bei der Behandlung der Hepatitis B Infektion wird Interferon Alpha (IFN- α) erfolgreich eingesetzt. Es kann die HBV-Replikation verringern oder unterdrücken sowie zu einem Rückgang der Leberentzündung führen. Interferon wird als Medikament subkutan körpergewichtsadaptiert 3x/Woche appliziert.

Das in der Studie verabreichte PegIntron® ist ein Depotinterferon mit längerer Halbwertszeit, das bislang für die Therapie der HBV-Infektion noch nicht zugelassen ist. Es ist ein kovalentes Konjugat des rekombinanten Interferon α 2b (IFN- α 2b) mit Monomethoxy-Polyethylenglykol und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 31.300 Dalton. Biologische Wirkung hat der IFN- α 2b-Anteil des Moleküls. Das rekombinante IFN- α 2b wird aus einem E.coli-Klon gewonnen, der ein gentechnologisch hergestelltes Plasmid mit dem aus humanen Leukozyten stammenden Gen für IFN- α 2b trägt.

IFN- α 2b entfaltet seine zelluläre Wirkung durch Andocken an spezifischen Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche. Es wird eine komplexe Kette

intrazellulärer Prozesse in Gang gesetzt. So kommt es zur Hemmung der Virusreplikation in virusinfizierten Zellen (Mechanismus nicht abschließend geklärt), zur Suppression der Zellproliferation und zur Aktivierung immunmodulatorischer Prozesse (u. a. Steigerung der Makrophagenaktivität und Stimulation spezifischer Lymphozyten).

2.3.2. Lamivudin

Lamivudin ist das (-)Enantiomer des 2'-3'Dideoxy-3'-Thiazylidin, ein Nukleosidanalogen. Der Einbau des aktivierten Triphosphates (3TC-TP) in den wachsenden DNA-Faden führt zum vorzeitigen Kettenabbruch und hemmt somit die virale DNA-Synthese.

In zahlreichen Studien wurde bewiesen, dass eine Lamivudintherapie bei Patienten mit HBeAg-positiver chronischer HBV-Infektion in einer signifikant höheren Zahl der Fälle zu einer HBeAg/anti-HBe-Serokonversion führt als bei Patienten aus den unbehandelten Kontrollgruppen (Lai et al. 1998; Dienstag et al. 1999; Liaw 2000; Schalm 2000).

Die Entwicklung Lamivudin-resistenter HBV-Mutanten ist ein großes Problem dieser Therapie. In Studien konnte eine Zunahme der viralen Resistenzen von 14% im ersten Behandlungsjahr auf 38%, 49% und 66% nach zwei, drei und vier Jahren gezeigt werden (Chang 2000; Liaw 2000; Leung 2001). Dieser Anstieg korreliert mit einer Zunahme der Leberentzündung und der Progression der chronischen Hepatitis B Infektion.

2.3.3. Adefovirdipivoxil

Adefovirdipivoxil ist die orale Vorläufersubstanz von Adefovir, einem azyklischen Nukleotidphosphonat-Analogen von Adenosinmonophosphat. Adefovir wird aktiv in die Säugetierzelle transportiert und dort durch wirtseigene Enzyme zu Adefovirphosphat umgewandelt.

Adefovirphosphat hemmt virale Polymerasen durch direkte Bindungskonkurrenz mit dem natürlichen Substrat (Desoxyadenosintriphosphat) und nach dem Einbau in die Virus-DNA durch DNA-Kettenabbruch (Balzarini 1989; Foster 1991; Nicoll et al. 1998). Zulassungsstudien haben gezeigt, dass Adefovirdipivoxil die Serum-HBV-DNA-Titer um zwei bis vier log-Stufen senken kann (Heathcote 1998; Hadziyannis et al. 2003; Marcellin et al. 2003) und ist

auch bei Lamivudin-resistenten HBV-Mutanten wirksam (Xiong 1998; Perrillo 2000).

2.4. cccDNA und antivirale Therapie

Der aktuelle Wissensstand deutet darauf hin, dass die Eradikation der chronischen Hepatitis B-Infektion wahrscheinlich die weitestmögliche Elimination der viralen cccDNA voraussetzt (Locarnini 1996).

Die mittlere Halbwertszeit der cccDNA *in vitro* in explantierten Leberzellkulturen beträgt drei bis fünf Tage (Civitico 1994), *in vivo* scheint die Überlebenszeit deutlich länger zu sein. Es wird vermutet, dass die cccDNA annähernd so stabil ist wie die Wirts-DNA, sie wird jedoch auch immer wieder durch Neusynthese gebildet (Newbold et al. 1995).

Das cccDNA-Reservoir stellt die antivirale Behandlung vor schwerlich zu überwindende Hürden. Da die HBV Replikation nicht auf einen semikonservativen Mechanismus zurückgreift, wird von einer Interferon alpha- oder Nukleotidanaloga-basierten Therapie nicht zu erwarten sein, dass sie direkt den bestehenden cccDNA Pool beeinflusst. Diese Überlegungen werden von den Erfahrungen in der klinischen Praxis bestätigt. Die fehlende Elimination der cccDNA durch eine Behandlung mit Interferon alfa wurde als einer der Hauptgründe für das Wiederauftreten des Hepatitis B-Virus nach der Beendigung der antiviralen Behandlung bereits vor einiger Zeit beschrieben (Yokosuka et al. 1985).

Auch in den Tiermodellen der Hepatitis B-Infektion scheint die cccDNA durch eine Nukleosidalogabehandlung vergleichsweise unbeeinträchtigt zu sein (Dean 1995; Moraleda et al. 1997), obwohl alle anderen viralen DNA Formen reduziert werden konnten. Die fehlende Reduktion oder gar Elimination mag durch die lange intrahepatische Halbwertszeit der viralen cccDNA erklärt werden.

Die Eradikation von cccDNA kann zum einen durch eine nicht-zytolytische, Zytokin-vermittelte Beseitigung des intrazellulären Virus oder zum anderen durch T-Zell vermittelte Zerstörung infizierter Zellen erreicht werden (Guidotti et al. 1999; Guo et al. 2000). In tierexperimentellen Studien lassen sich Hinweise

für den Einfluss beider Mechanismen finden. Die Rolle der antiviralen Chemotherapie mit Nukleosid- und Nukleotidanaloga könnte in einer Reduktion der viralen DNA-Formen im Zytoplasma der Zelle und extrazellulär liegen, die komplementär zu einer Reduktion der Neubildungsrate an cccDNA führen könnte. Die allmähliche Verminderung vorhandener cccDNA Moleküle könnte im Zusammenspiel mit dem Immunsystem des Wirts über zytolytische Mechanismen zu einer Ausheilung der Erkrankung beitragen.

Trotz der entscheidenden Rolle der cccDNA bei der chronischen Hepatitis B-Infektion konnten bislang nur wenige Daten von Patienten direkt erhoben werden (Miller et al. 1984; Yokosuka et al. 1985). Bei Patienten mit längerfristiger HBV-spezifischer Nukleosidanaloga-Behandlung könnte die Untersuchung auf das Vorhandensein und die Menge der intrahepatozellulären cccDNA ein Hilfsmittel zur Beurteilung der Effektivität der antiviralen Behandlung und die Wahrscheinlichkeit des Langzeit-Ansprechens darstellen, die eine Aussage darüber erlaubt, wann eine Behandlung beendet werden könnte. Die Quantifizierung der cccDNA durch konventionelle Techniken wie den Southern Blot ist nur eingeschränkt möglich, da häufig nur eine geringe Menge klinischen Materials aus der Leberbiopsie verfügbar ist und häufig nur wenige cccDNA Kopien in den Zellen vorhanden sind. Zudem bestehen ethische Barrieren bei der Gewinnung wiederholter Leberbiopsien bei Patienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung und während der antiviralen Behandlung.

2.5. Die Bedeutung der cccDNA und ihre quantitative Bestimmung

Die cccDNA dient als Transkriptionsvorlage der viralen Gene (Tuttleman et al. 1986, Newbold et al. 1995). Die Akkumulation der cccDNA im Kern der Hepatozyten und ihre lange Halbwertszeit ermöglicht eine stabile, antiviralen Therapiestrategien und dem Zugriff des Immunsystems schwer zugängliche, persistierende Infektion. Die cccDNA ist für die Aufrechterhaltung einer chronischen Hepatitis B-Virus Infektion verantwortlich. Dies bedeutet, dass die

HBV-Infektion vermutlich nur durch die weitestmögliche Elimination der cccDNA in den infizierten Leberzellen kuriert werden kann. Trotz der zentralen Rolle der cccDNA während einer HBV-Infektion und der Bedeutung des Verständnisses ihrer Eliminationsmechanismen beim Menschen konnten bislang nur unzureichend Daten über Zahl und Verbleib von cccDNA-Molekülen unter Therapie gewonnen werden.

Durch die kürzliche Entwicklung quantitativer PCR-basierter Methoden ist erstmals die numerische Bestimmung der cccDNA auch aus kleinen Proben wie einer Leberbiopsie möglich (Kock 1996; Mason 1998). Die ersten Protokolle beschrieben zunächst eine selektive PCR, die es erlaubte, die intrazelluläre cccDNA von der offenen zirkulären DNA und anderen replikativen Intermediärformen durch ein HBV-spezifisches Merkmal zu unterscheiden. Das offene zirkuläre HBV Genom liegt nur teilweise doppelsträngig vor, die DNA hat im Minus-Strang eine Lücke, der Plus-Strang ist von variabler Länge. Beim intrahepatischen cccDNA Molekül hingegen sind diese Regionen durchgängig doppelsträngig. So konnten cccDNA-spezifische Oligonukleotide entwickelt werden, die über die Lücke im Minus-Strang des offenen zirkulären HBV Genoms amplifizieren. Die cccDNA kann beim Einsatz der spezifischen Primer ungehindert amplifiziert werden, wohingegen es bei der Vervielfältigung der offenen, nur partiell doppelsträngigen HBV-DNA Formen zu einer ineffizienten Amplifikation kommt.

Die Selektivität der cccDNA-Primer ist jedoch nicht hundertprozentig. Durch die PCR können partielle Elongationsprodukte aus Teilen des offenen zirkulären Hepatitis B-Virus Genoms entstehen, die wiederum als Vorlage für eine weitere Vervielfältigung dienen. Die Spezifität der selektiven cccDNA-PCR konnte durch den Zusatz einer „Plasmid-Safe“ Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen DNase gesteigert werden, die sowohl die linearen doppelsträngigen DNA-Anteile als auch die geschlossen zirkulären, aber einzelsträngigen DNA-Anteile hydrolysiert. Unter Zusatz dieser DNase nach der DNA-Extraktion kann der unspezifische Hintergrund der Polymerasekettenreaktion in der Regel um das Zehnfache vermindert werden. Durch den Einsatz der beschriebenen Maßnahmen würde unspezifische HBV-DNA in 1000fachem Überschuss vorliegen müssen, bevor diese einen signifikanten Anteil an der quantitativen cccDNA Messung beitragen würde.

Die meisten PCR-basierten Versuchsansätze, die bislang für die Messung der HBV cccDNA entwickelt wurden, zogen hierfür die Bestimmungen am Endpunkt einer Polymerasekettenreaktion heran, die die Standardmethode für die Vervielfachung geringer DNA-Mengen ist. Ein solches Vorgehen bedarf aber in der Regel der gleichzeitigen Amplifikation eines internen Standards mit bekannter Kopienzahl und anschließender Bearbeitung, was das Risiko einer verfälschenden Kontamination erhöht. Durch die kürzlich erfolgte Entwicklung einer Echtzeit-PCR wird ein PCR-Produkt in dem Augenblick entdeckt, in dem es synthetisiert wird. Bei diesem Verfahren beruht die Quantifizierung auf der Reaktionskinetik der PCR, bei der ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der PCR-Zykluszahl, bei der das PCR-Produkt zuerst detektiert wurde, und der initialen Menge der Ziel-DNA besteht.

Voraussetzungen für das Echtzeit-PCR-Verfahren sind das Vorhandensein entsprechender Reaktionszusätze im PCR-Ansatz, die Signale proportional zur Menge des akkumulierten PCR-Produktes abgeben und ein Instrument, das in der Lage ist, diese Signale während des gesamten zyklischen PCR-Prozesses einzufangen. Diese Voraussetzungen wurden durch die Entwicklung geeigneter fluoreszierender Substanzen und eines Instruments, das die Fluoreszenz misst, wie zum Beispiel beim LightCycler™ von Roche (Grenzach, Deutschland), umgesetzt.

Der LightCycler™ ist ein Fluorimeter für sehr kleine Volumina. Er kombiniert die schnelle thermische Variabilität eines PCR-Gerätes mit der Echtzeit-Messung von Fluoreszenz. Die Fluoreszenz kann z. B. von dem so genannten „SYBR Green I“ stammen, das vorzugsweise an doppelsträngige DNA bindet. Auf ein auslösendes Signal hin entsendet der Farbstoff ein Fluoreszenz-Signal, das proportional zur neu synthetisierten DNA ist. Bei Nutzung des „SYBR Green I“-Farbstoffs muss die Spezifität des PCR-Produktes durch eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Amplifikation verifiziert werden. Spezifische Produkte werden durch das charakteristische Schmelzen bei geeigneten Maximaltemperaturen entdeckt, während Artefakte bereits bei niedrigeren Temperaturen schmelzen. Für eine noch spezifischere Detektion können gepaarte Hybridisierungssonden eingesetzt werden, die innerhalb der Amplifizierungsprimer zu liegen kommen und die bei gleichzeitiger gemeinsamer Anlagerung an die neu gebildete DNA fluoreszierende Signale

abgeben, die der Menge der neu synthetisierten DNA komplementär entsprechen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung einer neuartigen Echtzeit-PCR-Methode beschrieben, die es erstmals erlaubt, die aus Leberbiopsien chronisch HBV infizierter Patienten extrahierte cccDNA selektiv zu quantifizieren. Hierbei wurde die Zahl der cccDNA Moleküle vor und nach 48-wöchiger antiviraler Kombinationstherapie untersucht und zu virologischen, serologischen und histologischen Parametern ins Verhältnis gesetzt.

3. Materialien und Methoden

3. 1. Materialien

3.1.1. Substanzen

Aqua ad iniectabilia

Fa. Braun, Melsungen, Deutschland

Aqua bidest/deion

Laboreigene Aufbereitungsanlage

Beta-Globin Hybridization Probe Mix (10fach konzentriert), Light-cycler Red₆₄₀ labeled

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA

Beta-Globin Hybridization Probe Mix (10fach konzentriert), Light-cycler Red₇₀₅ labeled

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA

Beta-Globin Primer Mix (10fach konzentriert) [5µM]

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA

cccDNA spezifische Primer

-NCCC

5`- CTC CCC gTC TgT gCC TTC T -3`

-CCCAS

5`- gCC CCA AAg CCA CCC AAg -3`

Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Chromogen (R9) (Rosa), Lösung, enthält Tetramethylenbenzidin (TMB)

Monolisa HBsAgUltraTM, Fa. BioRad, München, Deutschland

Ethanol

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

H₂O, sterile, PCR grade

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA

HBsAg (0,5mg/ml), rekombinant ayw, Cat.8HS8

Fa. HyTest Ltd., Finland

HBV Plasmid

pHBVEcoR1

Spende von William E. Delaney, Fa. Gilead Sc., Foster City, CA, USA

Hepsera® 10mg Tabletten

1 Tablette enthält 10mg Adefovirdipivoxil= 5,45mg Adefovir

Fa. Gilead Sciences, Foster City, CA, USA

Human genomic DNA [15ng/μl], template for control reaction

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA

Hybridisierungsprimer (für Light-cycler-PCR)

-CCCFL

gTT CAC ggT ggT CTC CAT gCA ACg T—FL

Synthesemaßstab: 0,20μmol, Kondition: 3FL 3,0, Reinigung: HPCL

-CCCLC

Red₆₄₀-Agg TgA AgC gAA gTg CAC ACg gAC C—PH

Synthesemaßstab: 0,20μmo, Kondition: 5LC 3,0; Reinigung: HPCL

-CCFL

5`-CAC TCA CCA ACC TCC TgT CCT CCA A X

Synthesemaßstab: 0,20μmol, Kondition: 3FL 1,0; Reinigung: HPCL

-CCLC

5`-LC Red₆₄₀ TgT CCT ggT TAT CgC Tgg ATg TgT CT P

Synthesemaßstab: 0,20μmol, Kondition: 5LC 1,0; Reinigung: HPCL

Fa. TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland

Isopropanol

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Konjugat (R7)

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen HBsAg und polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen HBsAg, an Peroxidase gebunden, lyophilisiert

Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Konjugatverdünnungsmittel (R6)

Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, enthält BSA, Tween ®20, Immunglobulin (Rind) und Immunglobulin (Maus) mit Kontrollreagenz für Probenzugabe,
Konservierungsmittel: ProClin™300 (0,1%) und Ciprofloxacin (10µg/ml)
Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Konzentrierte Waschlösung (R2) (10fach konzentriert)

Tris-NaCl-Puffer, pH 7,4
Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Light-cycler-DNA Master Hybridization Probes

Light cycler control kit, Roche Diagnostics Corporation, IN, USA

MPC Protein-Precipitation Reagent

Fa. Epicentre, Madison, WI, USA

Negativkontrolle (R3)

Tris-HCl-Puffer, enthält BSA, Konservierungsmittel: ProClin™300 (0,1%)
Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4)

0,01 M phosphate buffered saline: NaCl 0,138M, KCl 0,0027M, pH 7,4
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

PegIntron®

Pegyliertes Interferon alpha 2b, gewichtsadaptiert dosiert
Fa. essexpharma über SP Europe, Brüssel, Belgien

Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase (1000 U/µl)

Fa. Epicentre, Madison, WI, USA über Fa. Biozym, Deutschland

Positivkontrolle (R4) (Human)

Tris-HCl-Puffer, enthält BSA mit Zusatz einer Mischung aus gereinigtem HBsAg der Subtypen ad und ay, Konservierungsmittel: ProClin™300 (0,1%)
Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Primer für Gesamt HBV Amplifikation

-CCS

5`-CTC gTg gTg gAC TCC TCT C – 3`

-CCAS

5`- CAg CAg gAT gAA gAg gAA – 3`

Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Stopplösung (R10)

1 N Schwefelsäurelösung

Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Substratpuffer (R8)

Zitronensäure und Natriumacetatlösung, pH 4,0, enthält H₂O₂ (0,015%)
und DMSO (4%)

Monolisa HBsAgUltra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Tissue and Cell Lysis Solution

Fa. Epicentre, Madison, WI, USA über Fa. Biozym, Hess. Oldendorf,
Deutschland

3.1.2. Werkstoffe und Geräte

37°C Brutschrank, HL 2000, Hybri Linker

KVP® Laboratory Products, USA

Akku-Pipette (10ml)

Fa. Pipetus®-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland

Automated Microplate Reader EL 808

Fa. Bio-Tec Instruments Inc., Vermont, USA

Bio Photometer (8,5mm)

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Einmal-Injektionskanülen „Butterfly“, Sterican

Fa. Braun, Melsungen, Deutschland

Handschuhe - Safe Skin Satin Plus

Fa. Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien

Klebefolie für Mikrotiterplatten

Monolisa HBsAg Ultra™, Fa. BioRad, München, Deutschland

Kuvetten für Photometer

UVette for Spectrophotometer, 50-2000µl, 2/10mm

Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Light cycler capillaries (20µl)

Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light cycler Instrument

Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Mikrotiterplatten (12 Streifen à 8 Vertiefungen)

Monolisa HBsAg Ultra™, Fa. BioRad, Deutschland

Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes“

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

MS2 Minishaker

IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland

Nunc Cryo Tube™ Vials (1ml)

Fa. Nalge Nunc International, Dänemark

Pipettierhilfen „pipetman“(10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)

Fa. Gilson, Middleton, WI, USA

Pipettenspitze Falcon® für Akku-Pipette

Fa. Becton Dickinson Labware, NJ, USA

Pipettenspitzen „SafeSeal-Tips“ (20µl, 200µl, 1000µl)

Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Reagenzgefäß 15ml, BlueMax™ Jr. 15ml, Polystyrene Conical Tube

Fa. Becton Dickinson Labware, NJ, USA

Serum-Röhrchen (5ml) zur Blutentnahme

Fa. Braun, Melsungen, Deutschland

Sonographiegerät “Combison 530”

Fa. Kretz Technik, Deutschland

Thermomixer compact

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge – Centrifuge 5415R

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge – Centrifuge 5417C

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Wasserbad, Typ 1083

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

3.2. Studiendesign

3.2.1. Einschlusskriterien

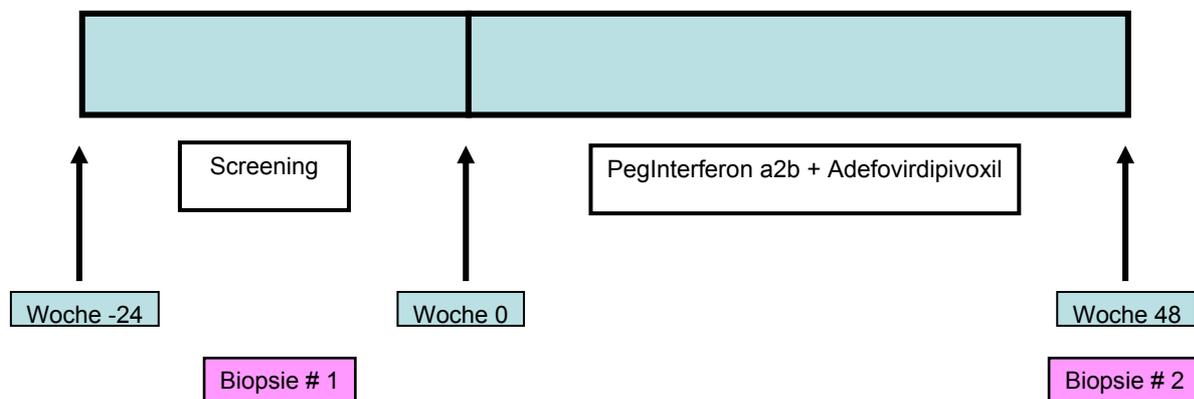
In die beschriebene antivirale Kombinationstherapiestudie wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 65 Jahren eingeschlossen, die mindestens sechs Monate vor Studieneintritt ein dokumentiertes positives HBsAg im Serum aufwiesen. Es wurden sowohl Patienten mit positiven (HBeAg+, HBeAk-) als auch mit negativem (HBeAg-, HBeAk+) HBeAg-Status in die Studie aufgenommen. Der HBV-DNA-Titer musste in der Screeningphase $> 10^5$ Kopien/ml Patientenserum betragen. Des Weiteren durften die einzuschließenden Patienten sechs Monate vor dem Therapiestart keine Medikamente mit antiviralem Potential (z. B. Adefovirdipivoxil, Lamivudin) und keine Immunglobuline oder Interferon alpha zur Behandlung der chronischen HBV-Infektion erhalten haben. Der Alaninaminotransferase (ALT) musste in der Screeningphase über den oberen Normwert erhöht sein. Die Patienten sollten bereit und in der Lage sein, zwei Leberbiopsien (vor Therapie und zum Therapieende) entnehmen zu lassen. Das Thyreoidea Stimulierende Hormon (TSH) musste im Normbereich liegen. Frauen mussten in der Screeningphase einen negativen Schwangerschaftstest aufweisen sowie mit einer kombinierte Empfängnisverhütung (z. B. Pille und Kondom) unter Therapie und bis sechs Monate nach Therapieende einverstanden sein, Männer mussten das Einverständnis zur Antikonzeption unter Therapie und sechs Monate nach Therapieende geben. Der HIV-Test musste negativ sein. Es musste eine schriftliche Einverständniserklärung vorliegen.

3.2.2. Ausschlusskriterien

Nicht in die Studie aufgenommen wurden Patienten mit schwerwiegenden somatischen oder psychiatrischen Erkrankungen, schwangere oder stillende Frauen, Patienten mit einer dekompensierten Leberzirrhose und einem Child-Pugh-Score >7 , Organ- und Knochenmarksempfänger, Patienten mit dem sonographischen Verdacht auf ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC), Patienten mit einem AFP-Wert $> 50\text{ng/ml}$, Patienten mit einer Immunschwäche, Patienten

mit Autoimmunerkrankungen und nicht kurativ behandelten Tumorerkrankungen, Patienten mit einer Leukopenie $< 2000/\mu\text{l}$ und/oder einer Thrombopenie $< 50000/\mu\text{l}$, Patienten mit instabiler koronarer Herzerkrankung, Patienten mit Depressionen, aktiv drogenabhängige Patienten, Patienten mit florider Schilddrüsenüber- oder -unterfunktion, Patienten, die mit nephro- oder lebertoxischen Medikamenten behandelt wurden sowie Patienten mit eingeschränkter Geschäftsfähigkeit, die die Einverständniserklärung nicht unterzeichnen konnten.

3.2.3. Studienverlauf



Woche 0 – Woche 48:

- 4-wöchentliche Kontrollen von: Klinik, Laborchemie, Blutbild, Virus, Serologie
- 12-wöchentliche Kontrollen von: TSH, CD4

Abbildung 3: Schema des Studienverlaufs. Innerhalb einer 24-wöchigen Screeningphase wurden die wichtigen laborchemischen, virologischen und persönlichen Daten der Patienten erhoben. Erfüllten die Patienten innerhalb der Screeningphase die Einschlusskriterien und traf keins der Ausschlusskriterien zu, wurden sie in die Studie eingeschlossen. Vor Beginn der Medikamenteneinnahme (Woche 0 = Baseline) wurde die erste Leberbiopsie durchgeführt. Ab Woche 0 wurden die Medikamente eingenommen. Alle vier Wochen wurden wesentliche laborchemische und virologische Marker im Blut bestimmt sowie die eventuell aufgetretenen Nebenwirkungen dokumentiert und ggf. behandelt. Die Therapie endete nach 48 Wochen Dauer. Am Therapieende wurde die zweite Leberbiopsie entnommen.

3.2.4. Endpunkte der Studie

Primärer Endpunkt:

Veränderung der cccDNA in den Leberzellen unter 48-wöchiger Therapie mit 12kDa pegyliertem Interferon alfa 2b und Adefovirdipivoxil.

Sekundäre Endpunkte:

Einfluss der Therapie auf biochemische, serologische, virologische und histologische Parameter.

Sicherheit und Verträglichkeit der Therapie.

3.2.5. Patienten

21 Patienten - 15 männlich, sechs weiblich - mit chronischer Hepatitis B Virus Infektion wurden in die klinische Phase II-Studie zur Behandlung der chronischen Hepatitis B Infektion mit einer Kombinationstherapie aufgenommen. Diese bestand aus gewichtsadaptiertem 12kDa pegyliertem Interferon alfa 2b subkutan 1 x wöchentlich (PegIntron®, Essex Pharma, München, Deutschland) und 10mg Adefovirdipivoxil per os täglich (Hepsera®, Gilead Sciences GmbH, Martinsried, Deutschland)

12 / 21 Patienten waren vor Studienbeginn HBeAg positiv und HBeAk negativ, 9 / 21 Patienten waren HBeAg negativ.

Der Median der HBV DNA Titer lag bei 2×10^6 Kopien pro Milliliter.

Der Altersdurchschnitt der Patienten war im Median 35 Jahre, der jüngste Patient war 19 Jahre alt, der älteste Patient 55 Jahre alt.

3.2.6. Ethikkommission Hamburg

Die Studie (Bearbeitungsnummer 1959, GS-01-522) war von der Ethikkommission Hamburg vorab positiv bewertet worden, alle Patienten hatten die Einverständniserklärung unterschrieben und sich mit den Studienbedingungen einverstanden erklärt.

3.3. Methoden

3.3.1. Leberbiopsieentnahme

Vor Therapiebeginn (Woche 0) wurde eine Leberbiopsie entnommen, zum Therapieende (Woche 48) wurde eine zweite Leberbiopsie entnommen.

Die Leberbiopsien wurden bis zum Zeitpunkt der experimentellen Auswertung bei -80°C asserviert.

Insgesamt lagen zum Zeitpunkt der Auswertung 40 gepaarte Leberbiopsien, je 20 zum Zeitpunkt Woche 0 sowie Woche 48, vor. Ein Patient lehnte die Biopsieentnahme zum Therapieende ab.

Diese sonographiegesteuerten Feinnadelpunktionen erfolgten standardisiert und komplikationsfrei in der Abteilung für Sonographie der Medizinischen Klinik I des Zentrums für Innere Medizin im UKE.

Es wurden jeweils zwei Proben entnommen, ein Biopsiezylinder wurde vom Institut für Pathologie des UKE histologisch ausgewertet, die zweite Probe wurde bei -80°C bis zur Auswertung asserviert.

3.3.2. HBV DNA Extraktion aus humanem Lebergewebe

HBV DNA aus gefrorenem humanen Lebergewebe wurde mit Hilfe des „MasterPure complete DNA und RNA purification kit“ (Fa. Epicentre technologies, Madison, WI, USA) gemäß der Gebrauchsanweisung extrahiert.

HBV-DNA- Extraktion aus gefrorenen Nadel-Leberbiopsien

- in ein Mikrozentrifugen-Hütchen (Mikrotube) auf Eis wurden 300 µl „Tissue and Cell Lysis Solution“ pipettiert,
- das gefrorene Lebergewebe der Nadelbiopsie wurde in den Mikrotube überführt
- vorsichtiges Auflösen des Lebergewebes im Hütchen
- 1 µl Proteinase K pro Tube wurde zugefügt [0,5mg/ml]. Der Verdau benötigte vier Stunden bei 65°C oder über Nacht bei 60°C

- schnelles Herunterkühlen der Proben vor der Inkubation mit RNase A für 30 Minuten bei 37°C
- 200 µl „Protein precipitation reagent“ wurden zugegeben, um die nicht benötigten Zellreste auszufällen. Die Ausfällung wurde durch Zentrifugation der Proben (10 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute) durchgeführt.
- der Überstand wurde in jeweils unbenutzte, vorab beschriftete Mikrotubes überführt
- 600 µl Isopropanol wurden zu dem aufgefangenen Überstand zugegeben, das Hütchen anschließend langsam über Kopf geschwenkt (20x)
- die DNA wurde mittels Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 13'000 Umdrehungen pro Minute ausgefällt
- Überstand wurde abpipettiert
- Zweimaliges Waschen des im Mikrotube verbleibenden DNA-Pellets mit 75%igem Ethanol
- Auflösen des DNA-Pellets mit 35 µl sterilem Wasser (ca. 100 bis 1000ng DNA pro µl, abhängig vom Volumen des Biopsats).

3.3.3. DNA Messung mit Eppendorf – Biophotometer

Vorbereitung der zu messenden Proben, Herstellung einer [1:50]-Verdünnung:

- saubere Mikrotubes wurden beschriftet
- in jeden Mikrotube wurden 147µl steriles Wasser pipettiert
- 3µl in sterilem Wasser gelöster DNA wurden zugegeben

DNA-Messung:

1. Einstellung des Biophotometers: Wellenlänge 260nm, Verdünnung der zu messenden Proben (3µl Probe + 147µl H₂O [1:50]).
2. Leerprobe: 150µl steriles Wasser wurden in eine Monovette pipettiert, die Monovette in das Biophotometer eingesetzt, die Leerprobe gemessen und die 150µl Wasser abpipettiert

3. Probenmessung: 150µl einer DNA-Probe wurden in die Monovette pipettiert, die Monovette in das Biophotometer eingesetzt, die Probe gemessen, dann Abpipettieren der Probe, abschließend zweimaliges Waschen der Monovette mit jeweils 150µl sterilem Wasser.

3.3.4. Herstellung der gebrauchsfertigen Proben

Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration:

$$OD_{260} \times \text{Faktor}^* \times \text{Verdünnung} / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

* für -RNA: 40
 -DNA: 50
 -Oligonukleotide: 30

Es wurde zunächst eine Stocklösung mit einer Konzentration von [100ng/µl] hergestellt, im Anschluß wurden diese zu gebrauchsfertigen Proben mit einer Endkonzentration von [2,5ng/µl] verdünnt.

3.3.5. DNA-Verdau zur Verbesserung der cccDNA-Spezifität

Plasmid-safe DNase-Verdau

Ein Teilmenge (5/35 µl = 500ng DNA) der extrahierten Lebergewebe-DNA wurde mit Hilfe der „ATP-abhängigen Plasmid-safe-DNase“ (Fa. Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) in einem Gesamtvolumen von 25 µl nach Zugabe von ATP (2µl 25mM ATP), 2,5µl 10fach Puffer und 2,5µl Plasmid safe DNase (25 Einheiten) 45 Minuten bei 37°C inkubiert und verdaut. Die Inaktivierung der Plasmid-safe-DNase erfolgte durch Inkubation bei 70°C für 30 Minuten. Abschließend wurden gebrauchsfertige Proben mit einer Endkonzentration von [2,5ng/µl] hergestellt. Diese Proben wurden für die cccDNA Quantifizierung genutzt.

3.3.6. DNA-Quantifizierung mit dem Light cycler System

Folgende Sequenzen der Primerpaare und Hybridisationsproben wurden für die Amplifikation benutzt:

Primerpaar für die gesamte HBV-DNA Amplifikation

	<u>Position</u>	<u>5`-3`</u>
2RC/CC S	256-274	CTC GTG GTG GAC TTC TCT C
2RC/CCAS	421-404	CAG CAG GAT GAA GAG GAA

Hybridisierungsproben

RC/CCFL	332-356	CAC TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA A
XRC/CCLC	359-384	TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CT

Spezifische cccDNA Primerpaare

	<u>Position</u>	<u>5`-3`</u>
NCCC1	1548-1566	CTC CCC GTC TGT GCC TTC T
CCCAS2	1903-1886	GCC CCA AAG CCA CCC AAG

Hybridisierungsproben

CCCFL	1625-1601	GTT CAC GGT GGT CTC CAT GCA ACG T X
CCCLC	1596-1572	AGG TGA AGC GAA GTG CAC ACG GAC C

Primerpaare für die Beta-Globin Amplifikation

	<u>Position</u>	<u>5`-3`</u>
PC 03	80-199	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
PC04	289-270	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

Hybridisierungsproben

CTWFL	205-239	CAA ACA GAC ACC ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GA X
CTWLC	241-269	AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGC GGC AA

Echtzeit-PCR-Bedingungen und das Verfahren des Light cycler Systems

Standard-Kurven

Für die lineare HBV-DNA-Standard-Kurve (totale und cccHBV-DNA) wurden seriell verdünnte Proben einer DNA-Standard-Schablone amplifiziert. Sie enthielten als Start-Schablone 10^6 HBV-Kopien/Kapillare, 10^5 Kopien/Kapillare, 10^4 Kopien/Kapillare, 10^3 Kopien/Kapillare, 10^2 Kopien/Kapillare, 10 Kopien/Kapillare sowie 1 Kopie/Kapillare.

Für die Amplifikation des Beta-Globin-Gens (zur Normalisierung der Zellzahl in den Leberbiopsieauszügen) wurden folgende Proben als Standardschablone amplifiziert:

Seriell verdünnte Humangenetische DNA (Roche, Grenzach, Deutschland) in den Konzentrationen 30ng/Kapillare (ca. 10000 haploide Genomäquivalente (ge)), 3ng/Kapillare (1000ge), 300pg/Kapillare (100ge), 30pg/Kapillare (10ge) und 3pg/Kapillare (1ge).

Als Negativ-Kontrolle wurde der Standard durch steriles Wasser ersetzt.

Vorbereitung der extrahierten Lebergewebe-Proben

Das extrahierte Lebergewebe wurde wie oben beschrieben zu einer Endkonzentration von [2,5ng/ μ l] verdünnt. 4 μ l der gebrauchsfertigen Probe wurden pro Kapillare amplifiziert. Jede Probe wurde zweifach pro PCR-Lauf amplifiziert.

Vorbereitung der Hybridisierungsprimer:

CCCFL, gelöst in 1500 μ l sterilem Wasser, einsetzbare Endkonzentration 4nmol.
CCCLC, gelöst in 750 μ l sterilem Wasser, einsetzbare Endkonzentration 2nmol.

3.3.7. Übersicht über die Methode der PCR-Amplifikation

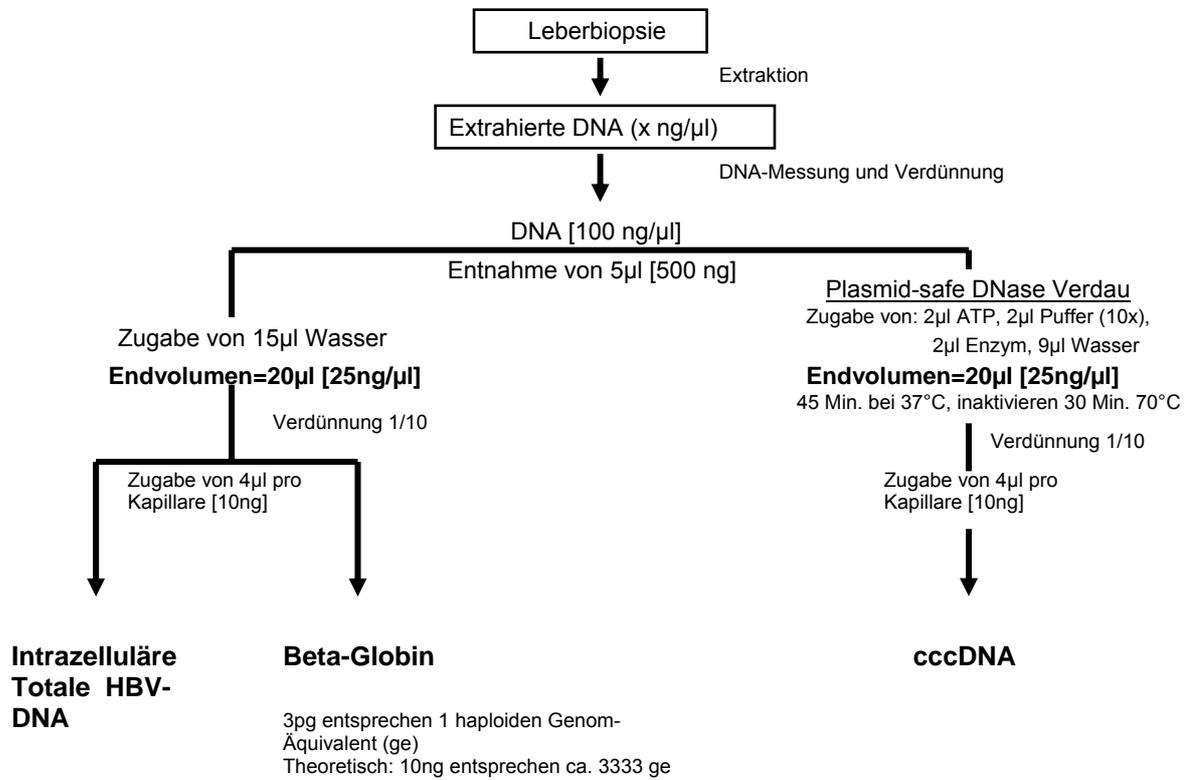


Abbildung 4: Schema zur Veranschaulichung der Arbeitswege bei der Quantifizierung der intrazellulären Gesamt HBV DNA, des Beta-Globins sowie der cccDNA.

3.3.8. Quantifizierung von cccDNA

Zur Bestimmung der cccDNA-Konzentration der Leberzellen wurde das entnommene Lebergewebe aufgereinigt, verdaut und die intrazelluläre DNA extrahiert. Die intrazelluläre DNA beinhaltet sowohl die intranukleäre cccDNA als auch die teilweise doppelsträngige im Zytoplasma vorkommende HBV-DNA. Mittels spezieller cccDNA-Primer, die nur zu einem Bruchteil zu einer Vervielfältigung der teilweise doppelsträngigen HBV-DNA führen, wurde mit dem Echtzeit-PCR-Verfahren die Menge der intranukleären cccDNA bestimmt. Um beurteilen zu können, wie viele cccDNA-Kopien pro Leberzelle vorkommen, wurde in einem parallelen Schritt die

Beta-Globin-Konzentration der zu untersuchenden Lebergewebeproben bestimmt. Beta-Globin ist ein Haushältergen, das in allen humanen Zellen in weitgehend gleicher Konzentration vorkommt. 3 Pikogramm (pg) der Beta-Globin DNA entsprechen dabei der Menge für ein haploides Genomäquivalent. Da die meisten Leberzellen aus einem euploiden Genom bestehen, sollten also pro Leberzelle 6 pg Beta-Globin DNA zu finden sein. Mit Hilfe der Beta-Globin-Konzentration konnte anschließend die durchschnittliche Anzahl der cccDNA-Moleküle pro Zelle berechnet werden.

Aus den Leberbiopsieproben wurde DNA mittels des MasterPure DNA Purification kit (Fa. Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) extrahiert. Vor der cccDNA Amplifikation wurden Teilmengen jeder DNA-Probe mit der Plasmid-safe-DNase behandelt. Die Echtzeit-PCR wurde mit dem Light-cycler (Roche, Grenzach, Deutschland) durchgeführt. Es wurde ein 20µl Reaktionsvolumen, das 20ng DNA (für die cccDNA-Quantifizierung ein Volumenäquivalent von 20ng vor DNase-Behandlung), 3 mmol/l MgCl₂, je 0,5 µmol/l Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,2 µmol/l der 3'-fluorescein (FL)-Probe sowie 0,4 µmol/l 5'-Red₆₄₀-Probe enthält, verwendet.

Vorwärts- und Rückwärts-Primer waren 5'- CTCCCCGTCTGTGCCTTCTC-3' (NCCC1 nt 1548-1566) und 5'- GCCCAAAGCCACCCAAG-3' (CCCAS2 nt 1903-1886) für die cccDNA-Amplifikation und 5'- CTCGTGGTGGACTTCTCTC-3' (2RC/CCS nt 256-274) und 5'- CTGCAGGATGAAGGAGGAA-3' (2RC/CCAS nt 421-404) für die intrazelluläre total-HBV-DNA-Bestimmung. FRET-Hybridisierungsproben waren 5'- GTTCACGGTGGTCTCCATGCAACGT-FL-3' und 5'-R₆₄₀- AGGTGAAGCGAAGTGCACA CGGACC-p-3' für die cccDNA-Amplifikation und 5'-CACTCACCAACCTCCTGTCCTCCAA-FI-3' und 5'-R₆₄₀-TGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCT-3' für die intrazelluläre totale HBV-Quantifizierung.

Die Amplifikation der totalen HBV-DNA wurde wie folgt durchgeführt: 95°C für 10 Minuten, dann 45 Zyklen bei 95°C à 10 Sekunden, 58°C für 10 Sekunden und 72°C für 15 Sekunden.

Die cccDNA-Amplifikation wurde folgendermaßen durchgeführt: 95°C für 10 Minuten, dann 45 Zyklen bei 95°C à 10 Sekunden, 58°C für 5 Sekunden, 10 Sekunden bei 63°C, 72°C für 20 Sekunden.

Die Beta-Globin-Amplifikation wurde mit Hilfe des Light cycler Beta-Globin kits (Roche, Grenzach, Deutschland) durchgeführt. Serielle Verdünnungen eines Plasmids, das ein HBV-Monomer trägt (pHBVEcoRI), wurde als Quantifizierungsstandard genutzt.

Die Detektionsgrenzen lagen für die cccDNA bei 3×10^{-4} (d.h. 3 Kopien auf 10000 Zellen) und für den totalen HBV-DNA-Assay bei 2×10^{-4} Kopien/Zelle.

3.4. HBsAg-Bestimmung aus asservierten Patientenseren

3.4.1. HBsAg-Bestimmung mit dem Testkit „Monolisa HBsAg Ultra“[®] von Bio-Rad

Gebrauchsfertige Reagenzien (bei Raumtemperatur):

Mikrotiterplatte

Reagenz 3 (R3): Negative Kontrolle

Reagenz 4 (R4): Positive Kontrolle

Reagenz 10 (R10): Stopplösung

Aufzulösende Reagenzien:

Konzentrierte Waschlösung (10fach): Reagenz 2 (R2):

Konzentrat wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, um gebrauchsfertige Waschlösung herzustellen. Für eine Platte mit 12 Streifen wurden 800ml benötigt.

Konjugatarbeitslösung (Reagenz 6 (R6) + Reagenz 7 (R7)):

Inhalt des Fläschchens des Konjugatverdünnungsmittels (R6) wurde in das Fläschchen des lyophilisierten Konjugats (R7) gefüllt. Das Fläschchen wurde verschlossen, zehn Minuten stehen gelassen unter gelegentlichem behutsamen Schütteln.

Enzymentwicklungslösung (Reagenz 8 (R8) + Reagenz 9 (R9)):

Chromogen (R9) wurde im Verhältnis 1:11 mit Substratpuffer (R8) verdünnt. Nach Rekonstituierung war die Reagenz bei lichtgeschützter Lagerung und Raumtemperatur (18-30°C) sechs Stunden haltbar.

Probenentnahme und Aufbereitung:

Blutproben wurden gemäß gültiger Richtlinien entnommen. Der Test sollte mit unverdünntem Serum oder Plasma durchgeführt werden (in EDTA-, Heparin-, Zitrat-, ACD-basierten Antikoagulanzen gesammelt). Eine Hämolyse sollte durch sofortige Zentrifugation vermieden werden.

Wurden die Proben bei +2-8°C gelagert, so sollte die Analyse innerhalb von sieben Tagen erfolgen.

Lagerten die Proben bei -20°C, so war eine Aufbewahrung über Monate möglich.

Wiederholtes Auftauen der Proben wurde vermieden.

Testdurchführung:

Negative (R3) und positive (R4) Kontrolle wurden für jede Bestimmungsreihe zum Validieren der Testergebnisse verwendet.

Es wurde eine Probenverteilung und ein Identifikationsplan festgelegt.

Die verdünnte Waschlösung wurde hergestellt.

Die Arbeitslösung aus den Konjugaten R6 und R7 wurde hergestellt.

Der Rahmen der Mikrotiterplatte und die benötigte Anzahl Streifen (R1) wurde aus der Schutzpackung entnommen.

Die Verteilung der Proben erfolgte nach folgender Reihenfolge:

In die Vertiefungen A1, B1, C1, D1 wurden 100µl der negativen Kontrolle (R3) pipettiert. In die Vertiefung E1 wurden 100µl der positiven Kontrolle (R4) pipettiert. In die Vertiefung F1 wurde 100µl der ersten Probe gegeben. In die Vertiefungen G1, H1, A2, B2 etc. wurden jeweils 100µl der weiteren zu untersuchenden Proben pipettiert. Im Anschluss wurden je 50µl der Konjugatlösung (R6+R7) schnell in alle Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und bei 37± 1°C 1,5 Stunden ± 5 Minuten lang inkubiert. Die Folie wurde entfernt. Der Inhalt aller Vertiefungen wurde abgesaugt und fünfmal mit jeweils 370µl verdünnter Waschlösung gewaschen. Die Menge der Rückstände durfte nicht mehr als 10µl betragen (ggf. wurden die Streifen umgedreht und auf Löschpapier ausgeklopft).

100µl der frisch vor der Verwendung hergestellten Entwicklungslösung (R8+R9) wurden anschließend schnell in alle Vertiefungen gegeben. Für die Entwicklung wurde die Platte lichtgeschützt bei Raumtemperatur (18-30°C) 30 ± 5 Minuten stehengelassen. Für diese Inkubation wurde keine Folie verwendet.

Es wurden 100µl Stopplösung (R10) zugesetzt.

Bis zum Ablesen des Ergebnisses musste mindestens vier Minuten, maximal 30 Minuten gewartet werden.

Der Boden der Mikrotiterplatte wurde sorgfältig abgewischt. Die Proben wurden mit einem Photometer bei 450/620-700nm abgelesen.

3.4.2. Serumproben-Verdünnungsreihe zur HBsAg-Quantifizierung

Die eingesetzten Serumproben wurden initial unverdünnt im Monolisa HBsAg Ultra Test inkubiert und mit Hilfe des Microplate Readers wurde die optische Dichte der Proben gemessen.

Aufgrund der optischen Dichte der Standards (siehe unten), die eine definierte Konzentration besitzen, sollten die HBsAg-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Aufgrund der hohen HBsAg-Konzentrationen der unverdünnten Proben war initial keine Differenzierung der HBsAg-Konzentrationen möglich, da die Werte weit höher lagen als der höchste HBsAg-Standardwert.

Wir führten einen Probenverdünnungsversuch durch, um zu ermitteln, bei welchen Konzentrationen eine Differenzierung der HBsAg-Konzentrationen möglich sei.

Dafür wurde eine Serumprobe eines Patienten der Woche 0 zufällig ausgewählt und einmal mit Wasser, einmal mit sterilem PBS verdünnt.

Folgende Verdünnungen wurden inkubiert

[1:10] [1:100] [1:1000] [1:10'000] [1:100'000]

Die Verdünnung [1:100'000] führte zu den Werten, die im Bereich der ermittelten Standardwerte lagen. Im Folgenden wurden alle Serumproben, sowohl der Woche 0 als auch der Woche 48 im Verhältnis [1:100'000] in sterilem PBS verdünnt.

3.4.3. HBsAg-Standard-Verdünnungsreihe

HBsAg (HyTest Ltd., Finnland)

HBsAg, Recombinant, ayw

Cat. 8HS8

0,5mg/ml, 1ml, 0,5mg

Lot 02/12-8HS8

HBsAg (Fa. Hytest, Finnland) wurde mit sterilem PBS zu folgenden Standard-Konzentrationen verdünnt:

Standard 1 (S1): [50 ng/ml]; (S2): [25 ng/ml]; (S3): [10 ng/ml]; (S4): [5 ng/ml]; (S5): [1 ng/ml]

3.4.4. Ermittlung einer HBsAg-Standardkurve

Mit Hilfe des Microsoft Excel-Programms wurde eine Standardkurve mit einer Steigungsgleichung ermittelt.

Für den im auszuwertenden Versuch ermittelten HBsAg-Standard ergab sich so folgende Steigungsgleichung $y=0,8086\ln(x)-0,0653$.

Mit Hilfe der Steigungsgleichung konnte durch Umstellung der Formel die HBsAg-Konzentration der Serumproben anhand der gemessenen optischen Dichte berechnet werden. Umgestellt lautet die Gleichung:

$$e^{((y-0,0653)/0,8086)} = x$$

Für „y“ wird die gemessene Optische Dichte eingesetzt, „x“ ist die gesuchte Konzentration in ng/ml nach Multiplikation mit der zuvor eingesetzten Verdünnung.

3.5. Histologische Beurteilung der Leberbiopsieproben

Die Entnahme von Lebergewebe erfolgte aus zwei Gründen. Zum einen wurden die Leberproben histologisch durch Pathologen untersucht, um den Einfluss der 48-wöchigen Kombinationstherapie auf die Leberhistologie (Entzündungsgrad und Vernarbungsstadium) zu beurteilen. Zum anderen wurde aus dem Lebergewebe die in den Leberzellkernen und -zellen vorhandene cccDNA- und HBV-DNA isoliert.

Das Grading bezeichnet den Entzündungsgrad des Lebergewebes, das Staging meint das Vernarbungs- oder Fibroestadium.

Um die entzündliche Aktivität und das Stadium des bindegewebigen Parenchymbaus klinisch verwertbar und reproduzierbar zu machen, wurde von

den die Leberproben untersuchenden Pathologen des Instituts für Pathologie im UKE der METAVIR-Score verwendet.

METAVIR-Score:

Einschätzung der Aktivität: Mottenfraßnekrosen; vier Unterteilungen (0-3). Intralobuläre Nekrose; drei Unterteilungen (0-2). Entzündungsreaktion innerhalb der Portalfelder; vier Unterteilungen (0-3). Brückennekrosen; zwei Unterteilungen (ja/nein)

Die hier erzielten Resultate werden mit Hilfe eines Algorithmus in vier Aktivitätsgrade umgewandelt:

A0: keine, A1: geringe, A2: mäßige, A3: starke Aktivität

Es werden außerdem fünf Fibrosestadien unterschieden:

F0: keine Fibrose, F1: portale Fibrose ohne Septen, F2: portale Fibrose mit wenig Septen, F3: zahlreiche Septen, keine Zirrhose, F4: Leberzirrhose

3.6. Berechnung des Upper Limit Normal- (ULN) Wertes des ALT-Wertes

Aufgrund unterschiedlicher Referenzbereiche des ALT-Wertes zu verschiedenen Zeiten im gleichen Labor, haben wir zur Vergleichbarkeit der Werte den ULN gemäß folgender Gleichung berechnet:

Im Labor bestimmter ALT-Wert/oberen Normwert (höchsten ALT-Wert im Referenzbereich) = ULN

Der ULN-Wert ist ein Multiplikationsfaktor. Er gibt an, wie stark der ALT-Wert oberhalb des oberen Referenzwertes erhöht ist. Deshalb findet sich in den Graphiken und Tabellen immer die Bezeichnung x ULN wieder.

4. Ergebnisse

In die Studie zur Kombinationsbehandlung der chronischen Hepatitis B Infektion wurden 26 Patienten eingeschlossen.

Für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von insgesamt 21 Patienten zu Woche 0 und Woche 48 herangezogen. Ein Patient hatte die Einwilligung zur Leberbiopsie am Ende der Kombinationsbehandlung abgelehnt, so dass in diesem Fall lediglich die laborchemischen und serologischen Daten zur Verfügung standen. Die in der Folge beschriebenen Daten beziehen sich auf die ersten 21 Patienten. Auf die in der unten stehenden Tabelle aufgeführten Parameter wird in der Folge im Einzelnen eingegangen.

Charakteristikum	Woche 0	Woche 48
Alter (Jahre)		
Median	35	
Intervall	19 – 55	
Geschlecht (Anzahl)		
Männlich	15	
Weiblich	6	
Ethnische Zugehörigkeit (Anzahl)		
Mitteleuropa	9	
Südeuropa	8	
Osteuropa	1	
Asien	3	
Serum Alaninaminotransferase (xULN)		
Median	3,09	1,1
Intervall	1 – 15,12	1-1,97
≤ ULN – no.	4	10
> ULN – no.	17	11
Serum HBeAg (Anzahl)		
Positiv	12	5
Negativ	9	16

Charakteristikum	Woche 0	Woche 48
Serum-HBV-DNA [Kopien / ml]		
Median	2x10 ⁶	100
Intervall	1x10 ² – 1x10 ⁸	<100-5x10 ⁶
< Nachweisgrenze – no.	1	9
≥ Nachweisgrenze – no.	20	12
Histologie (METAVIR SCORE) Entzündungsgrad	–	
Median	2	1
Intervall	1 – 3	1 - 2
Histologie (METAVIR SCORE) Fibrosestadium	–	
Median	1	1
Intervall	0 – 4	0 - 4
HBV DNA / Leberzelle [Kopien / Zelle]		
Median	602,81	4,47
Intervall	10,22 – 12703,81	0 - 23,67
cccDNA / Leberzelle [Kopien / Zelle]		
Median	6,43	0,22
Intervall	0,36 – 108,21	0 - 57,88
Serum-HBsAg [µg/ml]		
Median	257	136
Intervall	161-5606	109-718

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen Charakteristika von Woche 0 und Woche 48 im Vergleich. Alter der Patienten, ethnische Zugehörigkeit sowie Hepatitis B Virus Genotyp wurden nur für Woche 0 dargestellt.

4.1. Biochemie, Serologie und Histologie

4.1.1. Biochemisches Therapieansprechen

Zum Therapiestart (Baseline) wurden die ALT-Werte der an der Studie teilnehmenden Patienten bestimmt. Aufgrund unterschiedlicher Referenzbereiche der ALT-Werte wurde zur Vereinheitlichung der Daten der ULN-Wert (Upper Limit Normal) berechnet und graphisch dargestellt.

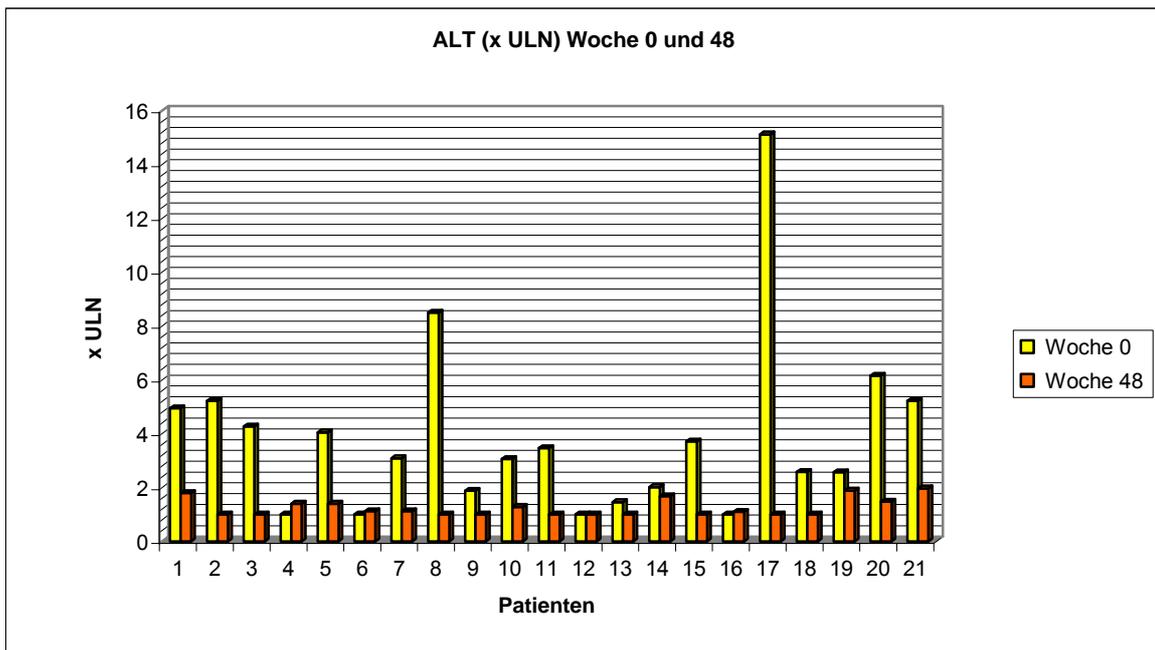


Abbildung 5: Vergleich der Upper Limit Normal- (ULN-) Werte zu Woche 0 und Woche 48. Am Tag des Therapiestarts (Woche 0) zeigten 17 von 21 Patienten über den Normwert erhöhte ALT-Werte. Bei vier Patienten (#4, #6, #12, #16) lagen die ALT-Werte zu diesem Zeitpunkt im Normbereich, waren aber in der Screeningphase erhöht gewesen. Die ALT-Erhöhungen lagen in einem Intervall von 1 bis 15,09 (Patient #17), im Median lag die ALT-Erhöhung bei 3,09 xULN. Bei zehn von 21 Patienten lagen die ULN-Werte zum Zeitpunkt des Therapieendes (Woche 48) im Normbereich, bei einem Patienten (#12) lag der ALT-Wert sowohl zu Woche 0 als auch zu Woche 48 im Normbereich, bei drei Patienten (#4, #6, #16) hatten sich die ALT-Werte gering verschlechtert, bei fünf Patienten war eine deutliche Besserung der ALT-Werte, wenn auch keine Normalisierung, eingetreten. Die ALT-Erhöhungen zu Woche 48 verteilten sich in einem Intervall von 1 bis 1,97, der Median betrug 1,1 (-64,4%).

4.1.2. Serologisches Therapieansprechen

Das serologische Therapieansprechen wird durch die HBsAg/Anti-HBs-Serokonversion und durch die HBeAg/Anti-HBe-Serokonversion beurteilt.

Im Verlauf der Therapie kam es bei vier (Patienten #2, #9, #16 und #21) von 21 Patienten zu einer HBsAg/anti-HBs-Serokonversion (diese Daten wurden nicht graphisch dargestellt). Bei diesen Patienten heilte die chronische HBV-Infektion aus, belegt durch Ausbildung von HBs-Antikörpern mit ansteigendem Titer.

Die zweite serologische Veränderung, die es zu beachten gilt, ist die HBeAg/Anti-HBe-Serokonversion, also der Verlust des HBeAg und die Ausbildung von Anti-HBe. Diese Serokonversion bedeutet keine Ausheilung der chronischen HBV-Infektion, aber eine deutliche Abschwächung der Aktivität und Aggressivität der chronischen Hepatitis B Infektion mit einer besseren Prognose bezüglich Morbidität und Mortalität (Lok et al. 2001).

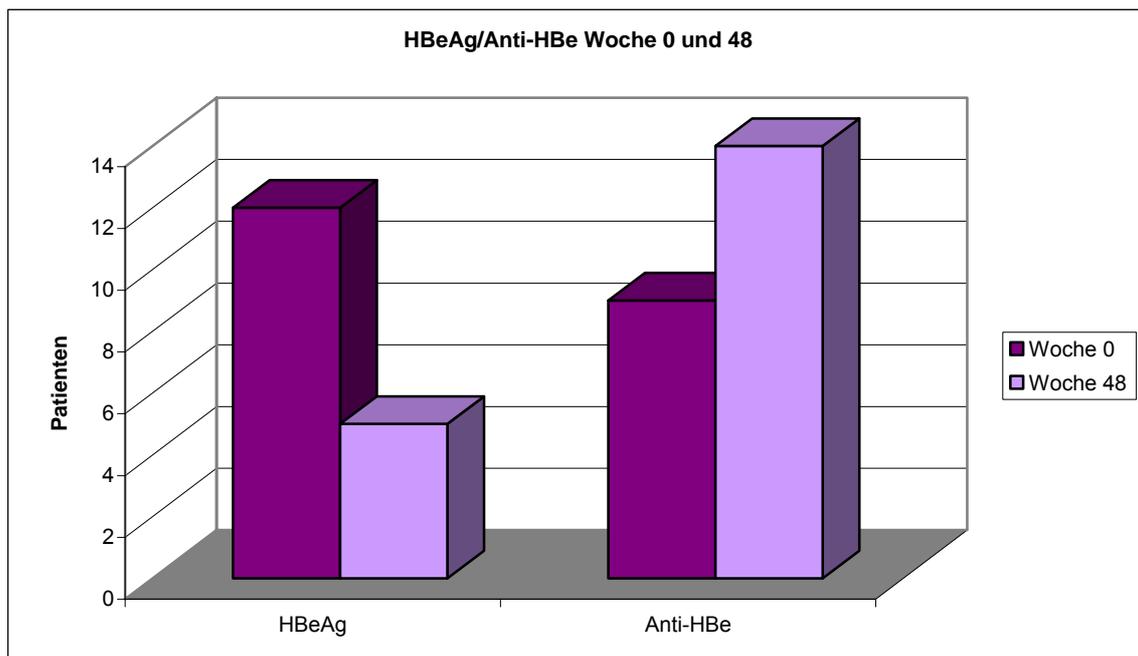


Abbildung 6: Vergleich der serologischen Parameter HBeAg und Anti-HBe Woche 0 und Woche 48 der Therapie. Zum Therapiestart (Woche 0) waren 12 Patienten HBeAg positiv und anti-HBe negativ, 9 Patienten waren HBeAg negativ und anti-HBe positiv. Im Therapieverlauf verloren sieben der 12 HBeAg-positiven Patienten das HBeAg, so dass nach 48-wöchiger Therapie noch fünf Patienten HBeAg positiv waren. Zwei dieser sieben Patienten verloren das HBeAg, bildeten jedoch kein Anti-HBe aus (Patienten #14 und #21).

4.1.3. Klinisch-virologisches Therapieansprechen

Zur Beurteilung des virologischen Therapieerfolgs und des antiviralen Potentials der eingesetzten Medikamente wurde die HBV-DNA im Serum der Patienten zu Woche 0 und zu Woche 48 bestimmt. Das virologische Ansprechen ist definiert als das Absinken der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenzen unterscheiden sich je nach auswertendem Labor und eingesetztem Test. Das in dieser Studie eingesetzte PCR-basierte Verfahren zur Messung der HBV-DNA hat eine Nachweisgrenze von 100 Kopien/ml Patientenserum.

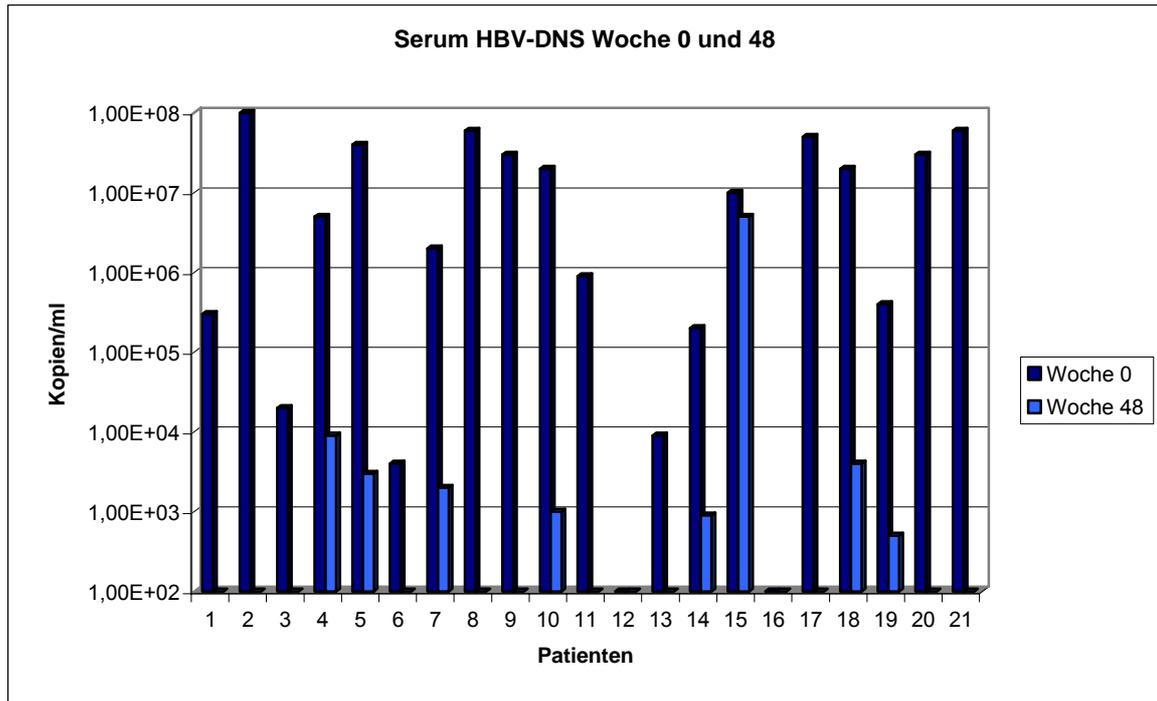


Abbildung 7: Darstellung der Veränderungen der HBV-DNA im Serum der Patienten zu Woche 0 und zu Woche 48. Zum Therapiebeginn lagen die HBV-DNA-Titer zweier Patienten (#12, #16) im Bereich der Nachweisgrenze von 100 Kopien/ml. Diese Patienten hatten in der Screeningphase erhöhte HBV-Titer aufgewiesen. Die HBV-Titer der übrigen 19 Patienten waren meist deutlich, d. h. $> 10^5$ Kopien/ml erhöht. Der Median der Virämie zu Woche 0 betrug 2×10^6 Kopien/ml. Nach 48-wöchiger Therapie hatte die Hepatitis B Virämie bei allen Patienten abgenommen. Bei neun Patienten (#2, #3, #6, #8, #9, #11, #12, #13, #17) lag die HBV-DNA zu Woche 48 unterhalb der Nachweisgrenze. Bei elf Patienten (#1, #4, #5, #7, #10, #14, #16, #18, #19, #20, #21) nahm die HBV-DNA-Konzentration deutlich um mehrere Zehnerpotenzen ab, lediglich bei einem Patienten (#15) hatte sich die Virämie nach 48-wöchiger Therapie kaum verringert. Der HBV-DNA-Median lag zu Woche 48 bei 1×10^2 Kopien/ml Patientenserum (-99,99%).

4.1.4. Histologisches Therapieansprechen

Ein histologisches Ansprechen liegt vor, wenn sich der Entzündungsgrad verringert und/oder sich das Vernarbungsstadium verbessert.

Zur deutlicheren Darstellung der Ergebnisse erfolgt die Aufteilung der Ergebnisse nach Entzündungsgrad und Fibrosestadium auf zwei Diagramme. Das erste Diagramm stellt die Veränderungen des Entzündungsgrades (Grading) der beurteilten Leberbiopsien im Vergleich Woche 0 und Woche 48 dar, das zweite Diagramm zeigt im Vergleich die Veränderungen der Fibrosestadien (Staging).

Entzündungsgrade, die sich zwischen zwei Stufen befinden, wurden der jeweils höheren Stufe zugerechnet.

A: Entzündungsgrad (Grading) der Leberbiopsien:

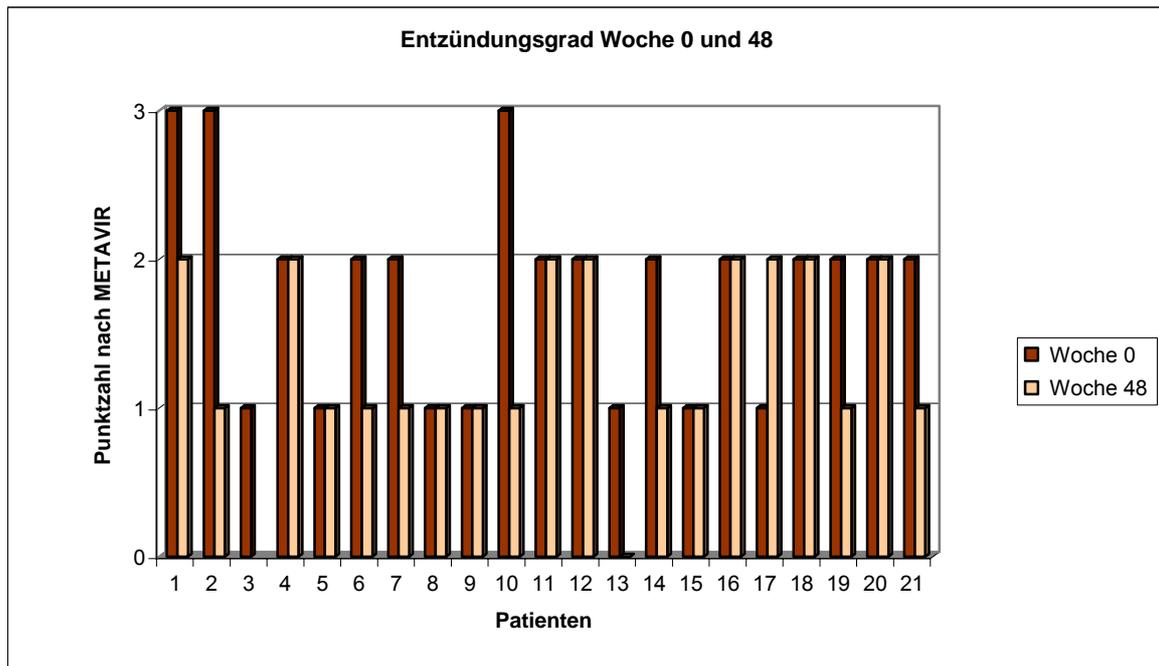


Abbildung 8: Darstellung der Veränderungen des Entzündungsgrades unter Therapie von Woche 0 bis Woche 48 anhand der Leberbiopsien. Patient #3 lehnte die zweite Biopsieentnahme am Therapieende ab. Zu Woche 0 hatten sieben Patienten ein leichte Entzündung (Grad 1) in der Leberbiopsie vorzuweisen, bei elf Patienten lag ein Entzündungsgrad 2 vor (mäßige Entzündung), drei Patienten wiesen eine stärkere Entzündung (Grad 3) auf. Nach 48-wöchiger Therapie verbesserte sich der Entzündungsgrad bei sieben Patienten um einen Punkt (#1, #6, #7, #13, #14, #19, #21), bei zwei Patienten verringerte sich die Entzündung um zwei Punkte (#2, #10), bei zehn Patienten blieb der Entzündungsgrad gleich (#4, #5, #8, #9, #11, #12, #15, #16, #19, #20), bei einem Patienten (#17) verstärkte sich der Entzündungsgrad um einen Punkt im METAVIR-Score.

B: Fibrosestadium (Staging) der Leberbiopsien:

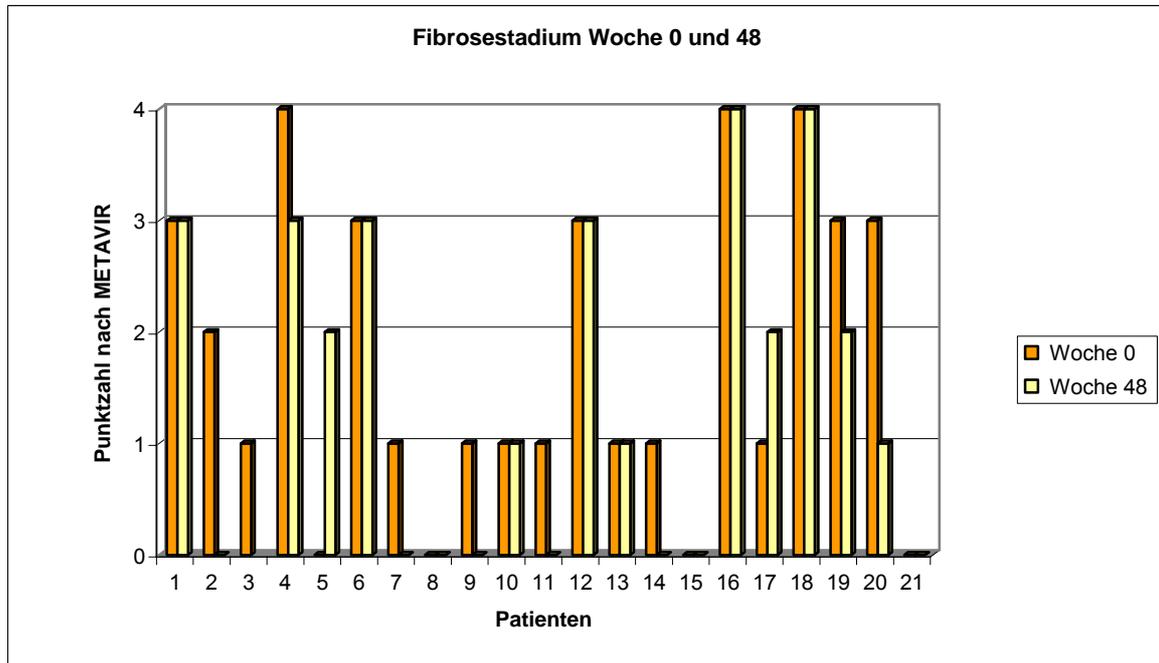


Abbildung 9: Histologische Fibrosestadien von Woche 0 und Woche 48. Initial hatten vier Patienten (#5, #8, #15, #21) ein Fibrosestadium 0 in der Leberhistologie, acht Patienten (#3, #7, #9, #10, #11, #13, #14, #17) wiesen ein Stadium 1 auf, bei einem Patienten (#2) wurde ein Stadium 2 diagnostiziert. Bei fünf Patienten (#1, #6, #12, #19, #20) lag initial bereits ein Stadium 3 vor, bei drei Patienten wurde feingeweblich eine Leberzirrhose (Stadium 4) diagnostiziert. Nach 48-wöchiger Therapie konnte bei acht Patienten (#2, #7, #8, #9, #11, #14, #15, #21) keine Vernarbung (Stadium 0) festgestellt werden, drei Patienten (10, #13, #20) wiesen ein Stadium 1 auf, bei ebenfalls drei Patienten (#5, #17, #19) wurde ein Stadium 2 diagnostiziert. In vier Biopsien (von den Patienten #1, #4, #6 und #12) wurde ein Stadium 3 ermittelt, in zwei Biopsien (Patienten #16 und #18) ein Stadium 4, eine Leberzirrhose. Insgesamt hatte sich das Fibrosestadium bei sechs Patienten (#4, #7, #9, #11, #14, #19) um einen Punkt verbessert, bei zwei Patienten (#2 und #20) um zwei Punkte. Unverändert im Vergleich zur Ausgangsbiopsie war das Fibrosestadium bei zehn Patienten (#1, #6, #8, #10, #12, #13, #15, #16, #18, #21), bei zwei Patienten verstärkte sich das Fibrosestadium, bei einem der beiden (#17) um einen Punkt, beim anderen (#5) um zwei Stadien. Zwischenstadien wurden dem nächst höheren Stadium zugeordnet.

4.2. Experimentell ermittelte virologische Daten

4.2.1. Anzahl der cccDNA-Moleküle pro Leberzelle. Vergleich der ermittelten Daten aus den Leberbiopsien zu Woche 0 und Woche 48

Die Messung der cccDNA-Konzentration aus den aufgereinigten Leberbiopsien wurde für jede Probe vierfach durchgeführt. Tabellarisch dargestellt wurden die aus den vier Messungen errechneten Mittelwerte.

In der folgenden Tabelle wurde die Anzahl der cccDNA-Kopien pro Zelle der ersten 21 Patienten im Vergleich von Woche 0 und Woche 48 dargestellt. Da Patient #3 die zweite Biopsie zum Therapieende ablehnte, standen für Woche 48 nur die Daten von 20 Patienten zur Verfügung.

Zu Woche 0 verteilten sich die Werte zwischen 0,36 Kopien/Zelle (Patient #4) und 108,21 Kopien/Zelle (Patient #5). Der Median der cccDNA-Kopien betrug 6,43 Kopien/Zelle.

Die Nachweisgrenze der cccDNA mittels des Echtzeit-PCR-Verfahrens liegt bei 3 Kopien/10000 Zellen.

Nach 48-wöchiger Therapie hatte die intranukleäre Anzahl von cccDNA pro Zelle bei 14 von 20 Patienten abgenommen. Bei neun dieser 14 Patienten lag die cccDNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 3 Kopien/10000 Zellen. Bei sechs der 20 Patienten hatte die durchschnittliche cccDNA-Menge pro Zelle unter Therapie zugenommen, bei jeweils drei Patienten nur sehr gering (#7, #10, #16), bei den Patienten #8, #12 und #18 deutlicher.

Der Median der cccDNA-Moleküle pro Leberzelle lag zu Woche 48 bei 0,22 Kopien/Zelle. Das entsprach einem Rückgang um 96,57% oder $-1,46\log_{10}$.

#	Woche 0	Woche 48
1	18,25	0,003
2	2,77	0,003
3	0,51	
4	0,36	0,003
5	108,21	57,89
6	0,61	0,003
7	18,73	20,45
8	9,41	22,4
9	39,69	0,04
10	3,68	4,83
11	3,56	0,003
12	1,84	5,52
13	2,13	0,003
14	11,57	7,73
15	38,19	8,35
16	2,1	2,67
17	14,73	0,003
18	6,43	10,5
19	0,39	0,003
20	27,93	0,4
21	25,81	0,003

Tabelle 2: Darstellung der cccDNA-Kopien pro Zelle im Vergleich von Woche 0 und Woche 48. Zu Woche 0 lag die Verteilungsbreite der cccDNA-Kopien pro Zelle zwischen durchschnittlich 0,36 Kopien/Zelle (#4) und 108,21 Kopien/Zelle (#5). Der errechnete Median der cccDNA-Moleküle/Zelle lag bei 6,43. Bei 14 der 20 abschließend biopsierten Patienten (Patient #3 lehnte die zweite Biopsie ab) hatte die Zahl der cccDNA-Kopien/Zelle unter Therapie abgenommen (Patienten: #1, #2, #4, #5, #6, #9, #11, #13, #14, #15, #17, #19, #20, #21). Bei neun dieser 14 Patienten war die cccDNA-Menge unter die Nachweisgrenze gesunken (Patienten: #1, #2, #4, #6, #11, #13, #17, #19, #21). Bei sechs Patienten nahmen die cccDNA-Kopien pro Zelle unter Therapie zu, bei den Patienten #7, #10 und #16 erfreulicherweise nur gering, bei den Patienten #8, #12 und #18 stärker. Im Median waren 0,22 cccDNA-Moleküle/Leberzelle zu Woche 48 zu finden.

4.2.2. Intrazelluläre HBV-DNA

Die Messung der intrazellulären HBV-DNA mit dem Echtzeit-PCR-Verfahren wurde für jede Probe vierfach durchgeführt. Die aufgeführten Daten stellen die Mittelwerte der vier Messungen dar.

Da der Patient #3 die zweite Biopsie ablehnte, wird für ihn nur der Befund der Woche 0 dargestellt.

Zu Woche 0 wurde bei einigen Patienten (z. B. # 6: 10,22 Kopien/Zelle) intrazellulär eine geringe HBV-DNA-Konzentration gemessen, bei anderen Patienten (z. B. #17: 12703,81 Kopien/Zelle) lag intrazellulär eine hohe Anzahl von HBV-DNA-Kopien vor.

Die Anzahl der HBV-DNA-Kopien pro Zelle von Woche 0 wurde mit denen der Woche 48 verglichen. Die HBV-DNA-Kopien pro Zelle wurden im Verlauf der 48-wöchigen Kombinationstherapie bei fast allen Patienten deutlich reduziert. Lediglich bei Patient #16 nahm die Menge der intrazellulären HBV-DNA vergleichsweise nur gering ab (von 17,5 Kopien/Zelle auf 10,01 Kopien/Zelle).

Der Median der intrazellulären HBV-DNA zum Therapiestart betrug 602,81 Kopien/Zelle, nach 48-wöchiger Therapie lag der Median bei 4,47 Kopien/Zelle. Die mediane Reduktion betrug 99,26% oder 2,13 Logarithmusstufen.

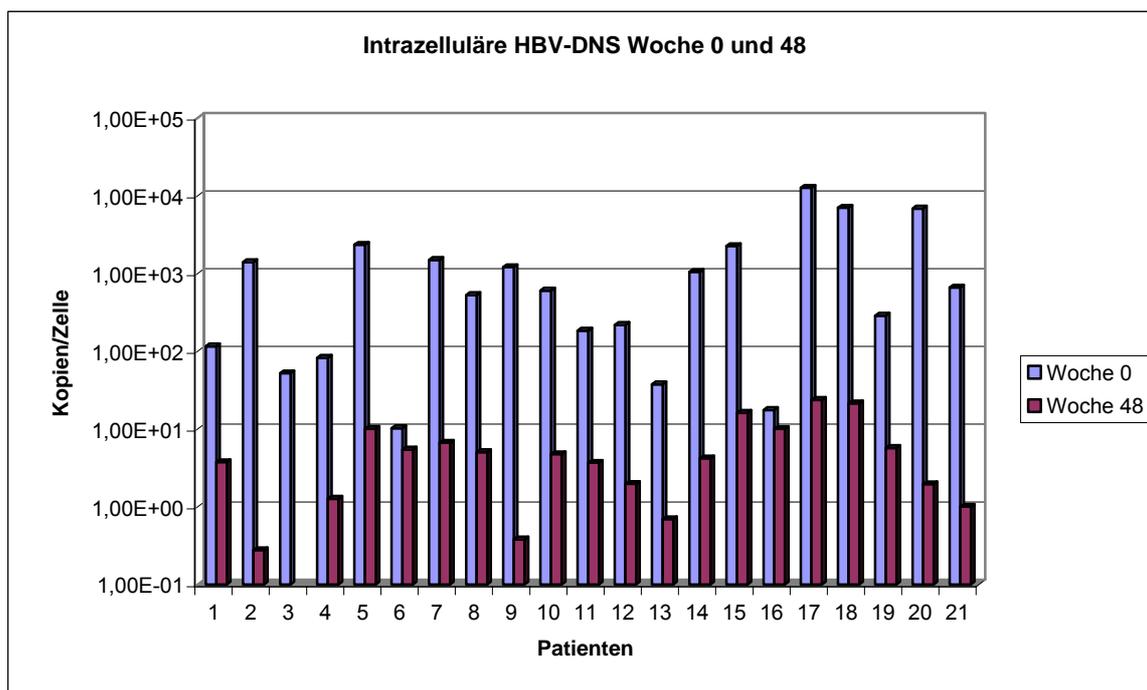


Abbildung 10: Darstellung der Kopien intrazellulärer HBV-DNA pro Leberzelle vor und nach 48-wöchiger Kombinationstherapie. Zu Woche 0 verteilten sich die intrazellulären HBV-DNA-Kopien zwischen Werten von 10,22 Kopien/Zelle (#6) und 12703,81 Kopien/Zelle (#17). Der Median lag bei 602,81 Kopien/Zelle. Nach 48-wöchiger Therapie hatte sich bei allen abschließend biopsierten Patienten die intrazelluläre HBV-DNA meist deutlich verringert. Lediglich bei Patient #16 nahm die Menge der intrazellulären HBV-DNA im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern nur gering ab. Da der Patient #3 eine erneute Biopsie ablehnte, wurde für ihn nur der Wert der Woche 0 dargestellt.

4.2.3. HBsAg Bestimmung

4.2.3.1. Evaluation eines geeigneten HBsAg-Standards

Als Standard wurden die Positivkontrollen aus dem Monolisa Testkit und konzentriertes HBsAg der Fa. Hytest, Finnland ([0,5mg/ml]) verwendet.

Zunächst wurde die Positivkontrolle aus dem Monolisa Testkit [0,1%] 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt. Im nächsten Schritt wurde das HBsAg der Fa. Hytest auf die Konzentrationen 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml und 1ng/ml verdünnt.

	1	2
A	Negativ 0,057	HBsAg [10µg] 3,214
B	Negativ 0,067	HBsAg [1µg] 3,271
C	Positiv 2,08	HBsAg [100ng] 3,023
D	Monolisa+ [1:5] 0,859	HBsAg [50ng] 2,894
E	Monolisa+ [1:10] 0,569	HBsAg [25ng] 2,774
F	Monolisa+ [1:20] 0,291	HBsAg [10ng] 1,599
G	Monolisa+ [1:50] 0,255	HBsAg [5ng] 0,97
H	Monolisa+ [1:100] 0,191	HBsAg [1ng] 0,391

Tabelle 3: Darstellung der Probenreihenfolge auf der Monolisa-Platte (obere Zeile des jeweiligen Tabellenfensters) und der mit dem Automated Microplate Reader EL 808 ® gemessenen optischen Dichten (untere Zeile des jeweiligen Tabellenfensters): 1. Streifen (1): Negativ = Negativkontrolle (R3) des Monolisa Testkits, Positiv = Positivkontrolle (R4) des Monolisa Testkits Monolisa: Positivkontrolle (R4) des Monolisa Testkits wurde im bestimmten Verhältnis (in eckigen Klammern) in PBS verdünnt. 2. Streifen (2): Das HBsAg der Fa. Hytest ([0,5mg/ml]) wurde entsprechend der in den eckigen Klammern notierten Konzentrationen in PBS verdünnt. Die optische Dichte der Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (R4) des Monolisa Testkits lag zwischen Werten von 0,856 [1:5 verdünnt] und 0,191 [1:100 verdünnt]. Die optische Dichte der HBsAg- (Fa. Hytest) Verdünnungsreihe (2. Streifen) ließ eine Differenzierung der HBsAg-Konzentrationen bei hohen HBsAg-Konzentrationen (10µg, 1µg, 100ng) nicht zu. Bei geringeren Konzentrationen (50ng/ml, 25ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 1ng/ml) war eine Differenzierung der optischen Dichte gut möglich.

Aufgrund der guten Differenzierungsmöglichkeiten der optischen Dichte bei Konzentrationen von 50ng/ml bis 1ng/ml des HBsAg der Fa. Hytest wurden diese Konzentrationen als HBsAg-Standard eingesetzt.

Mit Hilfe des Microsoft Excel®-Programms wurde eine Standardkurve erstellt. Diese zeigte einen logarithmischen Verlauf, deren Steigung durch die Gleichung $y=0,8086\ln(x)-0,0653$ wiedergegeben wurde.

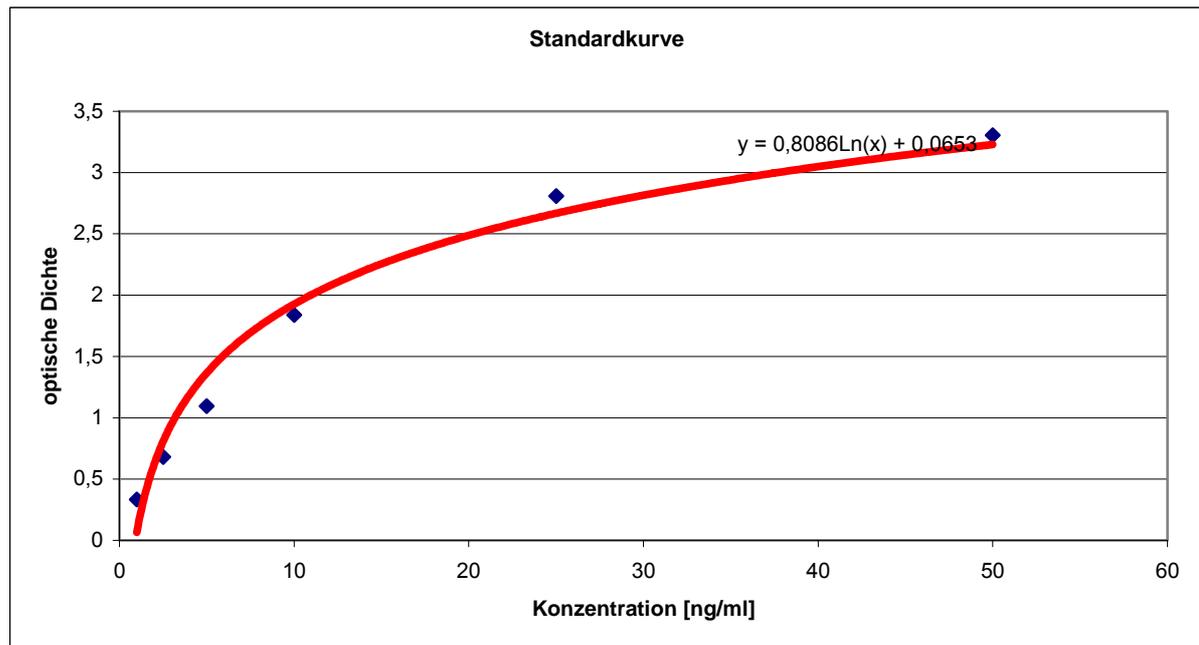


Abbildung 11: Darstellung der HBsAg-Standardkurve mittels Microsoft-Excel. Die Standardkurve hatte die Steigungsgleichung $y=0,8086\ln(x)-0,0653$.

4.2.3.2. Verdünnung des Patientenserums

In der Annahme, dass unverdünntes Patientenserum eine zu hohe HBsAg-Konzentration aufweisen würde, so dass sie mit den eingesetzten HBsAg-Standardkonzentrationen nicht verglichen werden konnte, wurden Versuche durchgeführt, um eine geeignete Verdünnung der Patientenseren zu ermitteln.

Der HBsAg-Standard wurde in Konzentrationen von 50ng/ml bis 1ng/ml eingesetzt.

Der erste Versuch zur Ermittlung einer sinnvollen Verdünnung der Patientenseren wurde mit den zufällig ausgewählten Patientenseren #7 und #25 durchgeführt.

Die Serumproben wurden unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt eingesetzt.

	1	2
A	Negativ 0,186	#7 [unv] 3,309
B	Negativ 0,141	#7 [1:10] 2,505
C	Positiv 1,697	#7 [1:100] 2,957
D	S1 0,996	#7 [1:1000] 2,972
E	S2 0,738	#25 [unv.] 2,64
F	S3 0,617	#25 [1:10] 3,243
G	S4 0,396	#25 [1:100] 2,867
H	S5 0,203	#25 [1:1000] 3,246

Tabelle 4: Darstellung der Probenverteilung auf der Monolisa-Platte. 1. Streifen (1): Die Negativ- (R3) sowie die Positivkontrolle (R4) stammten aus dem Monolisa Testkit. Der Standard (S1-S5) wurde mit dem HBsAg ([0,5mg/ml] der Fa. Hytest) hergestellt. S1 [50ng/ml], S2 [25ng/ml], S3 [10ng/ml], S4 [5 ng/ml], S5 [1ng/ml]. 2. Streifen (2): Patientenserum von #7 und #25 wurden jeweils in folgender Konzentrationsreihenfolge pipettiert: unverdünntes Serum (unv), 1:10 verdünnt, 1:100 verdünnt, 1:1000 verdünnt. Darstellung der gemessenen optischen Dichten der Proben in der jeweils zweiten Zeile eines Tabellenfensters. Die optischen Dichten der verdünnten Patientenseren (Streifen 2) waren in jeder Verdünnung deutlich höher als die des eingesetzten Standards (der Standard hatte eine optische Dichte von 0,996 bis 0,203). Es ließen sich zudem kaum Unterschiede der optischen Dichte zwischen dem unverdünnt eingesetzten Seren und den 1:1000 Verdünnungen feststellen. Eine zu erwartende Abnahme der optischen Dichte bei abnehmender Konzentration ließ sich nicht sinnvoll darstellen.

Die oben dargestellten Werte wurden nicht weiter verwertet.

Die optischen Dichten der verdünnten Patientenserum (Streifen 2) waren in jeder Verdünnung deutlich höher als die des eingesetzten Standards (der Standard hatte eine optische Dichte von 0,996 bis 0,203). Es ließen sich zudem kaum Unterschiede der optischen Dichte zwischen dem unverdünnt eingesetzten Serum und den 1:1000 Verdünnungen feststellen. Eine zu erwartende Abnahme der optischen Dichte bei abnehmender Konzentration ließ sich nicht sinnvoll darstellen.

In einem weiteren Versuch wurde das zufällig ausgewählte Patientenserum #7 in PBS und in Wasser verdünnt. Da im ersten Versuch die Proben mit PBS versetzt wurden, verzichteten wir bei dieser PBS-Verdünnungsreihe auf die Verdünnungen 1:10 und 1:100 und setzten nur die Verdünnungen 1:1000, 1:10`000, 1:100`000 und 1:1`000`000 ein. Das mit Wasser verdünnte Serum wurde in den Konzentrationen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10`000, 1:100`000, 1:1`000`000 in die Vertiefungen der Monolisa-Streifen gegeben.

	1	2
A	Negativ 0,08	PBS[1:1000000] 0,587
B	Negativ 0,088	Serum (unverdünnt) 3,537
C	Negativ 0,082	H2O[1:10] 3,578
D	Negativ 0,111	H2O[1:100] 3,22
E	Positiv 1,641	H2O[1:1000] 3,332
F	PBS[1:1000] 3,254	H2O[1:10000] 0,926
G	PBS[1:10000] 1,374	H2O[1:100000] 0,412
H	PBS[1:100000] 0,693	H2O[1:1000000] 0,271

Tabelle 5: Darstellung der Probenverteilung auf der Monolisa-Platte (obere Zeile jedes Tabellenfensters): 1. Streifen (1): Die Negativ- und die Positivkontrolle stammten aus dem Monolisa Testkit. Patientenserum #7 wurde in PBS wie folgt verdünnt: 1:1000, 1:10`000, 1:100`000, 1:1`000`000. 2. Streifen (2): Patientenserum #7 wurde unverdünnt und wie folgt in H₂O verdünnt: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10`000, 1:100`000, 1:1`000`000.

Darstellung der gemessenen optischen Dichten der unterschiedlich verdünnten Serumprobe des Patienten #7 (untere Zeile jedes Tabellenfensters). Die Negativkontrollen auf dem ersten Streifen nahmen Werte zwischen 0,08 und 0,111 an, die Positivkontrolle (Position E1) zeigte eine gemessene optische Dichte von 1,641. Es zeigte sich für die PBS-Verdünnungen eine deutliche Reduktion der optischen Dichte bei abnehmender Konzentration (Positionen F1, G1, H1, A2). Auch die mit Wasser hergestellte Verdünnungsreihe zeigte ab einer Verdünnung von 1:10`000 (Position F2) eine Reduktion der optischen Dichte.

Die Negativkontrollen auf dem ersten Streifen nahmen Werte zwischen 0,08 und 0,111 an, die Positivkontrolle (Position E1) zeigte eine gemessene optische Dichte von 1,641. Es zeigte sich für die PBS-Verdünnungen eine deutliche Reduktion der optischen Dichte bei abnehmender Konzentration (Positionen F1, G1, H1, A2). Auch die mit Wasser hergestellte Verdünnungsreihe zeigte ab einer Verdünnung von 1:10`000 (Position F2) eine Reduktion der optischen Dichte.

Aufgrund der guten Differenzierbarkeit bei einer Verdünnung der Patientenseren in PBS von 1: 100`000 wurde zur Evaluierung der Serumproben diese Konzentration herangezogen.

4.2.3.3. Messung der Serum-HBsAg-Konzentrationen zu Woche 0 und Woche 48

Die HBsAg-Konzentration aus den asservierten Serumproben der an der Studie teilnehmenden Patienten wurde mit Hilfe des Monolisa HBsAg Ultra™ Kits der Firma Biorad (München, Deutschland) zu Woche 0 und Woche 48 bestimmt.

Aufgrund der vorab durchgeführten Verdünnungsversuche wurden die Serumproben in einer Verdünnung von 1:100`000 eingesetzt. Als Standard wurde das HBsAg der Fa. Hytest ([0,5mg/ml]) in den Verdünnungen 50ng/ml, 25ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml und 1ng/ml eingesetzt.

Wie oben beschrieben, wurde mit Hilfe des Microsoft Excel-Programms eine Standardkurve mit der Steigungsgleichung $y=0,8086\ln(x)-0,0653$ ermittelt.

Mit Hilfe der Steigungsgleichung konnte durch Umstellung der Formel die HBsAg-Konzentration der Serumproben anhand der gemessenen optischen Dichte berechnet werden. Umgestellt lautet die Gleichung:

$$e^{((y-0,0653)/0,8086)}= x$$

Für „y“ wird die gemessene optische Dichte eingesetzt, „x“ ist die gesuchte Konzentration in ng/ml.

Da auch die Negativkontrollen eine messbare optische Dichte aufwiesen, im Mittelwert der vier Negativkontrollen einen Wert von 0,081, wurde auch hier die Konzentration mit Hilfe der Gleichung bestimmt und so der Wert für die Nachweisgrenze der HBsAg-Konzentrationen festgelegt.

Die Berechnung der Mittelwertkonzentration der Negativkontrollen ergab einen Wert von 1,02ng/ml, der als Nachweisgrenze übernommen wurde.

Da die Patientenserum initial 1:100'000 in PBS verdünnt worden waren, wurden die in ng/ml ermittelten Konzentrationen mit 100.000 multipliziert. Die folgenden Ergebnisse werden in µg/ml dargestellt.

Um die Relationen zu gewährleisten, wurde die Konzentration der Nachweisgrenze ebenfalls mit 100'000 multipliziert und ergab so eine Nachweisgrenze von 102µg/ml.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Mittelwerte dieser vierfach aus den Serumproben von 21 Patienten von Woche 0 und Woche 48 ermittelten Ergebnisse dargestellt.

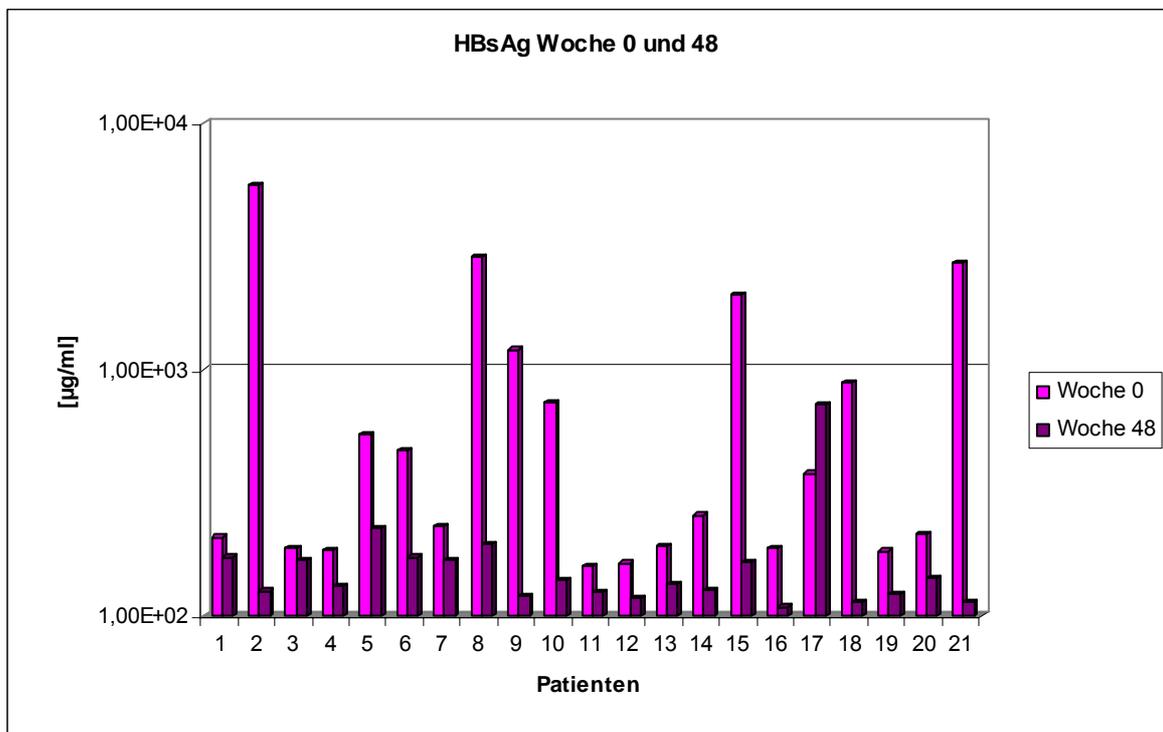


Abbildung 12: Vergleich der HBsAg-Konzentrationen aus den asservierten Serumproben der Woche 0 und der Woche 48. Zu Woche 0 verteilten sich die HBsAg-Konzentrationen zwischen 161µg/ml (#11) und 5606µg/ml (#2). Der Median der HBsAg-Konzentration beträgt 257µg/ml. Bei 20 der 21 Patienten nimmt die Konzentration des HBsAg im Therapieverlauf ab. Lediglich bei Patient #17 war ein Anstieg der HBsAg-Konzentration zu verzeichnen. Die HBsAg-Konzentration lag zu Woche 48 in einem Intervall von 109 bis 718 µg/ml, der Median betrug 136mg/ml. Die Nachweisgrenze, die mit Hilfe der optischen Dichte der Negativkontrollen berechnet wurde, lag bei 102µg/ml.

5. Diskussion

5.1. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Quantifizierung der intrahepatozellulären cccDNA aus Leberbiopsien von chronisch HBV infizierten Patienten vor und nach einer 48-wöchigen Kombinationstherapiestudie. Die Veränderungen der cccDNA unter Therapie sollten mit den Veränderungen der biochemischen, virologischen, serologischen und histologischen Parameter korreliert werden.

5.2. Quantifizierung der cccDNA pro Leberzelle

Die Anzahl der cccDNA-Kopien pro Zelle aus den Leberbiopsien der an unserer Studie teilnehmenden Patienten lag zu Woche 0 zwischen 0,36 und 108,21 Kopien pro Zelle mit einem Median von 6,43 cccDNA Molekülen / Zelle. Eine Studie, die die cccDNA aus Lebergewebeproben ebenfalls mittels PCR bestimmte, kam auf ähnliche Konzentrationen von 0,03 bis zu 173,1 Kopien pro Zelle (Chen 2004). Die Mehrzahl der Studien berichtet über eine Verteilungsbreite von 5-50 Kopien pro Zelle (Miller et al. 1984; Tuttleman et al. 1986; Jilbert 1992; Kajino et al. 1994), so auch eine kürzlich durchgeführte Einzelzellanalyse mit einem cccDNA-Kopien-Intervall von 1 bis 17 Kopien pro Nukleus (Zhang et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene cccDNA Kopienzahl vor Therapiebeginn liegt somit in der Größenordnung, die aus vorangegangenen Studien bekannt ist.

5.3. Intrinsische Stabilität der cccDNA

Die cccDNA stellt im natürlichen Verlauf der Hepatitis B-Infektion ein sehr stabiles Molekül mit einer langen Halbwertszeit dar, die an die Lebensdauer der Hepatozyten heranreicht (Bowden 2004). Faktoren, die dazu beitragen, dass

die cccDNA nur langsam eliminiert wird, sind: (1) das Vorliegen der cccDNA als chromatinisiertes

Episom (Newbold et al. 1995), (2) der asymmetrische Replikationszyklus bei den Hepadnaviren, der den cccDNA-Pool davor schützt, direkt durch Polymeraseinhibitoren (wie z. B. Adefovirdipivoxil) degradiert zu werden (Tuttleman et al. 1986; Moraleda et al. 1997; Marcellin et al. 2003), (3) die bevorzugte Verwendung viraler DNA zur Auffüllung des cccDNA-Pools, die bereits in Nukleokapsiden im Zytoplasma vorliegt (Wu et al. 1990) und (4) die Möglichkeit der Reinfektion der Hepatozyten durch residuelles zirkulierendes Virus (Delmas et al. 2002).

Aussagen über die intrinsische Stabilität der cccDNA konnten durch die vorliegende Arbeit nicht direkt getroffen werden. Die Dauer der Kombinationstherapie (48 Wochen) und die entsprechenden Leberbiopsien wurden u. a. aufgrund der im Folgenden angeführten Beobachtungen festgesetzt.

Civitico und Locarnini (Civitico 1994) konnten *in vitro* in einer nicht-proliferierenden Enten-Leberzellkultur (infiziert mit DHBV) eine nur kurze Halbwertszeit von 3 bis 5 Tagen für die cccDNA nachweisen. Sie maßen in diesem Experiment den Umsatz des bereits bestehenden cccDNA-Pools in infizierten Enten-Hepatozyten, nachdem diese in ein Medium mit Bromodeoxyuridin gegeben worden waren. Bromodeoxyuridin ist ein Nukleosid, das in neu gebildete cccDNA eingebaut wird und ihre spezifische Dichte erhöht. Nicht-markierte cccDNA mit der ursprünglichen Dichte zeigte im Folgenden eine Halbwertszeit von 3 bis 5 Tagen. Dieses Ergebnis ließ sich mit den Ergebnissen weiterer *in vitro*- und *in vivo*-Experimente nicht in Einklang bringen. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass zum einen der cccDNA-Pool in Leberzellkulturen schnell ansteigt, bedingt durch die gesteigerte Zellproliferation, die in Leberzellkulturen 50- bis 100-fach höher sein kann als in der intakten Leber. Zum anderen inhibierte das in diesem Experiment eingesetzte Bromodeoxyuridin die Transkription und Replikation des DHBV (Tuttleman et al. 1986; Civitico 1994). Eine Kombination dieser beiden Effekte mag dazu geführt haben, dass die Halbwertszeit der cccDNA unterschätzt wurde.

In einem Kulturversuch mit infizierten Waldmurmeltierhepatozyten (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV) zeigte sich trotz 24-tägiger antiviraler Therapie mit konsekutiver signifikanter Verminderung der WHV-DNA im Kulturmedium keine Reduktion des cccDNA-Pools (Dandri et al. 2000), was eine längere Halbwertszeit

voraussetzt. Addison et al. (Addison 2002) konnten in ihrem mit DHBV infizierten Pekingtonen durchgeführten Lebendversuch eine Halbwertszeit der cccDNA zwischen 35 und 57 Tagen feststellen. Zhu et al. (Zhu 2001) kamen in ihrer Studie mit WHV-infizierten Waldmurmeltieren auf eine cccDNA-Halbwertszeit von 33 bis 50 Tagen. Auch Tsiang und Gibbs (Tsiang 2004) unterstützen die These, dass die cccDNA eine lange Halbwertszeit besitzt. Sie berechneten mit Hilfe eines mathematischen Modells basierend auf Studiendaten von Patienten aus einer Adefovir-Substudie, dass für die komplette Elimination von cccDNA in einer chronisch infizierten humanen Leber ungefähr 14,5 Jahre nötig seien.

Die Vermutung von Civitico und Locarnini (Civitico 1994), dass die cccDNA eine nur kurze Halbwertszeit besitzt, wurde durch viele Studien (Dandri et al. 2000; Zhu 2001; Addison 2002; Bowden 2004) widerlegt, so dass nach heutiger vorherrschender Ansicht nur eine Langzeittherapie zu einer deutlichen Reduktion der cccDNA führen kann.

5.4. Kinetik der cccDNA-Reduktion

Die in dieser Kombinationstherapiestudie eingesetzten Medikamente sind nicht in der Lage, direkt gegen die im Nukleus der Hepatozyten vorliegenden cccDNA-Moleküle zu wirken. Das Nukleotidanalogen Adefovirdipivoxil wirkt primär im Zytoplasma der Leberzellen auf die prägenomische RNA (pgRNA) und die virale Polymerase. Die Wirkung des Interferon alfa ist vorwiegend immunmodulierend und zytolytisch. Die Therapiestrategie einer Kombinationstherapie dieser beiden synergistisch wirkenden Medikamente beinhaltet die Unterbrechung des intrazellulären cccDNA-Amplifikationsmechanismus (Tuttleman et al. 1986), in dem die für die cccDNA-Synthese notwendigen Vorläufermoleküle eliminiert werden. Eine Auffüllung

des cccDNA-Pools durch neu in die Zelle eingetretenes Virus wurde durch Hemmung der Virionenproduktion praktisch unterbunden. Aufgrund der nur kurzen Halbwertszeit des HBV von sieben bis 12 Stunden, ließen sich so rasch alle zirkulierenden infektiösen Virionen eliminieren.

Als sicher gilt, dass die cccDNA das „Gedächtnismolekül“ der chronischen Hepatitis B Infektion darstellt. Locarnini et al. postulierten, dass die cccDNA den limitierenden Faktor für die zur Zeit erhältliche antivirale Therapie darstellt (Locarnini et al. 1999), wird sie doch für die Hepatitis B Virus Reaktivierung nach dem Absetzen der antiviralen Therapie verantwortlich gemacht (Dienstag 1995; Lai et al. 1998; Dienstag et al. 1999). Der cccDNA-Pool wird in der frühen Infektionsphase auf ca. 20 cccDNA-Moleküle pro Zelle aufgestockt, bevor die Virusproduktion in der neuinfizierten Zelle beginnt (Jilbert 1992; Kajino et al. 1994). Dabei entsteht die cccDNA nicht ausschließlich durch von außen in die Zelle gelangtes Virus, sondern eben auch durch den intrazellulären cccDNA-Amplifikationsmechanismus (Tuttleman et al. 1986). Der Versuch, die Virusetablierung durch eine vor der Infektion beginnende antivirale Therapie zu verhindern, zeigte lediglich eine geringe Reduktion der cccDNA-Moleküle pro Zelle und konnte die Neuinfektion der Zellen nicht verhindern, obwohl die Neusynthese viraler replikativer Intermediärprodukte vollständig unterdrückt war (Köck 2003).

In dieser Kombinationstherapiestudie konnte erstmals gezeigt werden, dass es bei 14 von abschließend 20 biopsierten Patienten zu einer deutlichen Reduktion der cccDNA in den Zellkernen kam.

Bei neun dieser 14 Patienten lag die cccDNA-Konzentration am Therapieende unterhalb der Nachweisgrenze von 3 Kopien auf 10'000 Leberzellen.

Bei sechs der 20 Patienten nahm die Menge der intranukleären cccDNA zu. Bei jeweils drei Patienten nur gering, bei den anderen verstärkt.

Verschiedene Geschwindigkeiten der Verminderung der cccDNA unter antiviraler Behandlung war Addison et al. (Addison 2002) in einem Versuch mit DHBV-infizierten Pekingtonen aufgefallen. Dort hatte die Menge der cccDNA unter antiviraler Therapie, verifiziert durch wiederholte Leberbiopsien, bei drei Enten exponentiell abgenommen. Bei zwei Enten nahm die cccDNA-Konzentration innerhalb der ersten 70 Tage ebenfalls exponentiell ab, stabilisierte sich aber daraufhin auf ca. 6 Kopien pro Zelle. Der Grund für dieses

unterschiedliche Therapieansprechen konnte nicht geklärt werden. Die Möglichkeit, dass sich medikamentenresistente Virusmutanten gebildet hatten, war unwahrscheinlich, zumal im vorliegenden wie in Addisons Versuch eine antivirale Kombinationstherapie eingesetzt wurde.

Tsiang et al. (Tsiang et al. 1999) beschrieben die Eliminationskinetik des Hepatitis B Virus unter antiviraler Therapie als zweiphasig. In der ersten Phase wurden die zirkulierenden HBV-DNA-Formen rasch reduziert, was durch die Hemmung der Polymerase in den Hepatozyten erklärt wurde. Es folgte eine langsame Phase, in der, so wurde vermutet, möglicherweise infizierte Leberzellen eliminiert wurden.

Werle-Lapostolle et al. (Werle-Lapostolle 2004) nahmen an, dass die cccDNA-Elimination eher der langsamen zweiten Phase folgt. Die bereits oben beschriebene lange Halbwertszeit der cccDNA und die langsame Eliminationskinetik derselben legten die Vermutung nahe, dass die cccDNA nur durch eine Langzeittherapie deutlich reduziert werden könnte. Die Befürchtung, dass es sonst zu einer erneuten,

verstärkten Replikation der Hepatitis B Viren käme, wurde vielfach beschrieben (Dienstag 1995; Dienstag et al. 1999; Liaw 2000; Lewin et al. 2001; Lok et al. 2001). Lewin et al. (Lewin et al. 2001) postulierten, dass eine medikamentöse Kontrolle der HBV-Infektion so lange durchgeführt werden müsse, bis der Wirt eine wirksame Immunantwort ausbilden kann. Boni et al. (Boni et al. 1998; Boni et al. 2001) fanden erfreulicherweise heraus, dass die antivirale Therapie mit den Nukleot(s)idanaloga Adefovirdipivoxil und Lamivudin zu einer teilweisen Aktivierung der Immunantwort führt, die für eine wirksame Viruskontrolle nötig ist. Eigene vorläufige Ergebnisse scheinen diese früheren Arbeiten zu bestätigen (Daten nicht gezeigt). Unter der in dieser Therapiestudie eingesetzten Kombinationstherapie kam es bei einigen Patienten im Verlauf der Therapie zu einer verstärkten T-Zell-Antwort gegen virale Epitope wie das HBs-Antigen oder kurze Sequenzen der Polymerase, die mittels Elislots ermittelt werden konnten.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Kombinationstherapie dieses Patientenkollektivs nach 48-wöchiger Dauer nicht beendet, sondern mit einer Adefovirdipivoxil-Monotherapie für zunächst 96 Wochen fortgesetzt. Am Ende dieser 96-wöchigen Monotherapie wird erneut eine Leberbiopsie entnommen

und die cccDNA quantifiziert. Bei Patienten, die eine HBsAg/Anti-HBs-Serokonversion durchgemacht hatten, wurde die Behandlung für 24 Wochen beibehalten.

5.5. cccDNA und HBsAg

Die transkriptionell aktive cccDNA dient als Matrize für alle viralen Proteine, u. a. auch für die HBs-Proteine. Ihre Reduktion müsste somit zu einer konsekutiven Verminderung des HBsAg im Serum führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der cccDNA in den Nuklei der Hepatozyten mit der Reduktion des HBsAg im Serum der Patienten positiv korrelierte.

Werle-Lapostolle et al. (Werle-Lapostolle 2004) zeigten kürzlich ebenfalls, dass die Mengen an HBsAg und cccDNA unter antiviraler Therapie parallel abfielen und postulierten, dass die Reduktion des HBsAg im Serum auf eine Reduktion der transkriptionell aktiven cccDNA zurückzuführen sei.

Dandri et al. (Dandri et al. 2000) konnten in ihren mit WHV-infizierten Waldmurmeltierhepatozyten unter Adefovirdipivoxil-Therapie keine Veränderung der HBsAg-Konzentration feststellen. Da die cccDNA ebenfalls konstant blieb, wurde ebenfalls die Abhängigkeit des HBsAg von der cccDNA postuliert.

In der hier durchgeführten Studie nahm das HBsAg bei 20 der 21 Patienten ab, bei einem Patienten zu. Die cccDNA wurde bei 14 von 20 Patienten reduziert.

Eine mögliche Erklärung für die Reduktion des HBsAg trotz Zunahme der cccDNA bei einigen Patienten ist, dass unter der Therapie die transkriptionelle Aktivität der cccDNA abgenommen hat. Möglicherweise könnte diese Aktivitätsabnahme auch ein Grund für die Vermehrung der cccDNA-Moleküle sein, um eine im Gesamtergebnis gleich bleibende Transkriptionsaktivität bei gleichzeitiger Reduktion der Aktivität der einzelnen cccDNA-Moleküle zu gewährleisten. Da nur etwa eins von 1000 HBsAg-Molekülen in die Virushülle des infektiösen Virions eingebaut wird (Lok et al. 2001), und die übrigen HBsAg-Moleküle möglicherweise dem frühzeitigen Abfangen von Anti-HBV-Antikörpern dienen, würde diese Abwehrfunktion durch die Reduktion der HBsAg-Moleküle geschwächt.

5.6. cccDNA und HBsAk

Obwohl die am Ende dieser Kombinationstherapiestudie quantifizierte cccDNA bei insgesamt neun von 20 Patienten unterhalb der Nachweisgrenze (NWG) lag, befand sie sich doch lediglich bei zwei der vier Patienten, die eine HBsAg/Anti-HBs-Serokonversion durchgemacht hatten, unterhalb der NWG. Zwei der Patienten, bei denen die chronische HBV-Infektion ausheilen konnte, wiesen am Studienende noch geringe Mengen cccDNA auf, bei einem dieser zwei Patienten war die initial niedrige cccDNA-Konzentration sogar geringfügig angestiegen (von 2,1 auf 2,67 Kopien/Zelle). Bei beiden Patienten mit ausgebildeten anti-HBs und residuell nachweisbarer cccDNA in den Leberbiopsien am Ende der Kombinationstherapie war die Serokonversion erst zu Woche 44 bzw. mit dem Ende der Kombinationsbehandlung aufgetreten. Möglicherweise ließ sich in diesen Leberbiopsien noch cccDNA nachweisen, weil die Halbwertszeit der cccDNA-Moleküle lang ist und die Leberbiopsie kurz nach bzw. während der HBs-Serokonversion durchgeführt wurde. Möglich wäre weiterhin, dass es sich bei der residuell nachweisbaren cccDNA um cccDNA-Fragmente handelt, die funktionell nicht aktiv sind.

Andererseits lässt sich vermuten, dass die Ausbildung von HBsAk nicht zwangsläufig mit dem vollständigen Verlust der cccDNA einhergehen muss. Rehermann et al. (Rehermann et al. 1996) vermuteten bereits, dass für die Ausheilung der chronischen Hepatitis B Infektion nicht die komplette Elimination des Virus nötig sei, vielmehr müsse das Immunsystem des Wirts eine dauerhafte Kontrolle der Virusreplikation ausüben.

Auch andere Studien konnten zeigen, dass bei Patienten, die HBsAg eliminiert und anti-HBs ausgebildet hatten, was mit der biochemischen und histologischen Ausheilung der chronischen HBV-Infektion einherging, noch residuelle Mengen cccDNA im Zellkern nachweisbar waren. Es bestand weiterhin eine „okkulte“ HBV-Infektion (Cacciola et al. 1999; Cacciola et al. 2000). Das fortbestehende Vorkommen geringer Mengen kompletter, funktionsfähiger Viruskopien erklärte, warum es in Zeiten starker Immunsuppression, z. B. durch eine Chemotherapie oder nach Organtransplantation, zu einer Reaktivierung der Hepatitis B Infektion kommen konnte (Lau et al. 1997; Dhedin et al. 1998; Castells et al. 2002).

Weitere Studien konnten bei HBsAg negativen Patienten mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) ebenfalls noch geringe Mengen cccDNA im Zellkern und zum Teil auch HBV-DNA im Serum nachweisen (Ghandi 2000; Yuen 2004). Boni et al. (Boni et al. 1998; Boni et al. 2001) diskutierten, ob nicht gar geringe Mengen cccDNA zur dauerhaften Stimulation der Antikörperproduktion und damit zur Aufrechterhaltung der Antikörperproduktion und Immunität gegen eine Neuinfektion nötig seien.

Umgekehrt stellt sich die Frage, ob die cccDNA unterhalb eine bestimmte Kopienzahl/Zelle reduziert werden muss, damit HBsAk gebildet werden können. Die cccDNA lag bei einigen Patienten nach Therapie unterhalb der Nachweisgrenze, oder es wurde nur eine geringe Konzentration detektiert, dennoch ging dies nicht zwangsläufig mit der Ausbildung von HBsAk einher. Sieben der neun Patienten, bei denen die cccDNA zum Therapieende unterhalb der Nachweisgrenze lag, bildeten keine HBsAk aus und konnten die chronische HBV Infektion bislang nicht ausheilen.

5.7. Mechanismen der cccDNA-Elimination

Über die Mechanismen der cccDNA-Eliminierung wird aktuell kontrovers diskutiert. Zum einen wird vermutet, dass eine cccDNA-Reduktion mit erhöhtem Zellumsatz und Zelltod einhergeht (Moraleda et al. 1997; Addison 2002). Für diese These sprach in Addisons Studie, dass die Leberproben der Tiere, die eine kontinuierliche cccDNA-Reduktion erreichten, eine deutlich erhöhte Anzahl PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, ein Proliferationsmarker)-positiver Zellkerne in der angefärbten Leberhistologie aufwiesen. Summers et al. (Summers et al. 2003) vermuteten in ihrer Studie zur Ausheilung der akuten WHV-Infektion in infizierten Waldmurmeltieren ebenfalls, dass ein erhöhter Zellumsatz und folglich der Zelltod für den cccDNA-Verlust und die Ausheilung der akuten WHV-Infektion nötig seien. Sie konnten zeigen, dass die während der Ausheilung gebildeten nicht infizierten Hepatozyten die Tochterzellen der vormals infizierten Leberzellen darstellten. Somit war die absolute Zahl der infizierten Hepatozyten zurückgegangen, die Menge an cccDNA im einzelnen infizierten Hepatozyten jedoch weitgehend konstant geblieben. Weitere Studien, die die Ausheilung einer natürlichen Infektion in Enten, Waldmurmeltieren und

Schimpansen untersucht hatten, zeigten ebenfalls, dass die Viruselimination durch einen Verlust infizierter Zellen zustande kam (Jilbert 1992; Kajino et al. 1994; Guo et al. 2000; Thimme et al. 2003). Diese in Leberbiopsien nachgewiesene Mottenfraßelimination infizierter Zellen und die parallel verlaufende Akkumulation uninfizierter Zellen ließen vermuten, dass die Elimination des Virus durch die Abtötung infizierter Zellen durch immunologische Prozesse stattfand.

Zum anderen wird ein nicht-zytolytischer Mechanismus der Viruselimination angenommen. Hierzu wurde die Ausheilung der akuten Hepatitis B Infektion ebenfalls in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Es wurde angenommen, dass während der akuten HBV-Infektion, bzw. der entsprechenden WHV- und DHBV-Infektion, die gesamte Hepatozytenpopulation befallen wird (Jilbert 1992; Kajino et al. 1994; Guidotti et al. 1999; Guo et al. 2000; Thimme et al. 2003). Erstaunlich war, dass eine so weitreichende Infektion in den meisten Fällen innerhalb relativ kurzer Zeit (vier bis sechs Monate) geheilt werden konnte, ohne dass es zu bedrohlichen Lebersynthesestörungen kam. Aufgrund dieser Beobachtung wurde spekuliert, dass ein anderer Hemmmechanismus der Virusreplikation für die Viruselimination verantwortlich sein müsste als der Zelltod. Zhu et al. (Zhu 2001) unterstützten diese These durch den Nachweis, dass die Anzahl HBcAg-positiver Zellen in WHV-infizierten Walddarmmeltieren, die immunhistochemisch gefärbt und dargestellt wurden, auch nach Ausheilung der Erkrankung nach mehrmonatiger Behandlung konstant geblieben war. Eine ähnliche Beobachtung hatten auch Werle-Lapostolle et al. gemacht. In ihrem Patientenkollektiv war es zwar zu einer Verminderung der cccDNA Kopienzahl in den untersuchten Stanzzyllindern gekommen, doch auch hier zeigte sich die Menge der HBcAntigen positiven Leberzellen unter antiviraler Behandlung konstant. Sie schlussfolgerten, dass die cccDNA-Kopienzahl pro infizierte Zelle zurückging. Unterstützt wurde diese These durch einen Versuch mit transgenen HBV-infizierten Mäusen, bei denen die Hepatitis B Virämie durch die Zytokine Interferon alpha ($INF-\alpha$) und Tumor Nekrose Faktor alpha ($TNF\alpha$) reduziert wurde, ohne dass ein zytopathischer Effekt auftrat (Guidotti et al. 1999). Thimme et al. (Thimme et al. 2003) konnten in ihrer Studie den Einfluss von nicht-zytotoxischen Effekten von CD8+-T-Zellen auf die Viruselimination zeigen.

Für die vorliegende Arbeit ergibt sich die Vermutung, dass diejenigen Patienten, bei denen die cccDNA zum Therapieende unterhalb der Nachweisgrenze lag, einen höheren Zellumsatz aufwiesen als die übrigen Patienten, bei denen abschließend noch cccDNA messbar war. Eine Aussage dazu ist durch die hier dargestellten Daten jedoch nicht möglich, da aufgrund der Invasivität und Risiken keine seriellen Leberbiopsieentnahmen möglich waren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine immunhistochemische Anfärbung der gepaarten, vor und nach 48 Wochen Therapie entnommenen Biopsien für das Hepatitis Bc-Antigen und / oder Hepatitis Bs-Antigen, um die Anzahl der infizierten Zellen zu bestimmen. Ein vorwiegend zytolytischer Eliminationsmechanismus müsste sich in einer Reduktion HBcAg / HBsAg positiver Hepatozyten am Therapieende niederschlagen, bei einer nicht-zytolytischen Verminderung der cccDNA müsste die Zahl der infizierten Leberzellen weitgehend konstant bleiben. In der mit Adefovirdipivoxil behandelten Zellkultur WHV-infizierter Waldmurmeltierhepatozyten wurde trotz Zugabe eines Proliferationsfaktors (Epidermal growth factor, EGF) kein erhöhter Zellumsatz festgestellt (Dandri et al. 2000). Weitere Hinweise, dass kein erhöhter Zellumsatz nötig ist, um die cccDNA zu eliminieren, liefert die Studie von Werle-Lapostolle et al. (Werle-Lapostolle 2004). Betrachtet man den biochemischen Marker ALT, der beim Zugrundegehen der Leberzelle in die Blutbahn abgegeben wird, so konnte weder in der Arbeit von Werle-Lapostolle et al. (Werle-Lapostolle 2004) noch in der hier vorliegenden Studie eine Erhöhung des biochemischen Markers vor und während der HBsAg/Anti-HBs-Serokonversion und der cccDNA-Reduktion festgestellt werden. Diese Daten unterstützen somit die These, dass ein nicht-zytolytischer Mechanismus an der cccDNA-Reduktion beteiligt ist. Bei einem der hier untersuchten Patienten kam es jedoch zu einer Erhöhung der ALT nach Therapieinitiierung, die einer HBsAg/Anti-HBs-Serokonversion wenige Wochen vorausging.

Zusammengefasst bleibt es aber trotz zahlreicher Untersuchungen akuter Infektionen bei Waldmurmeltieren und Schimpansen weiterhin unklar, ob für die Ausheilung der HBV-Infektion nur eine nicht-zytolytische T-Helferzellantwort-Typ1 (TH1-Antwort) (Guidotti et al. 1999; Thimme et al. 2003) verantwortlich ist, oder ob die cccDNA-Elimination lediglich durch einen immunvermittelten Zelltod, gefolgt von einer Zellteilung (Kajino et al. 1994; Guo et al. 2000;

Summers et al. 2003), vermittelt wird, oder ob beide Mechanismen an der Ausheilung beteiligt sind, was nach vorliegendem Datenmaterial am wahrscheinlichsten ist.

Interessant in diesem Zusammenhang erscheint die Berechnung von Moraleda (Moraleda et al. 1997). Sie vermutete, dass die cccDNA nur in einem langwierigen Prozess durch den Ersatz der infizierten Leberzellen eliminiert werden könnte. Abhängig sei die cccDNA-Elimination von der Halbwertszeit der Hepatozyten. Die liegt bei Patienten mit aktiver Virushepatitis bei etwa zehn bis 100 Tagen (Nowak 1996), bei nicht infizierten Waldmurmeltieren beträgt die Lebensdauer der Hepatozyten sechs bis zwölf Monate. Mason et al. (Mason et al. 1996) konnten in ihrer Studie zeigen, dass es durch die WHV-Infektion bei Waldmurmeltieren zu einem zehn- bis 20-fachen Anstieg der Zellproliferation kommt, was durch einen Anstieg HBcAg positiver Hepatozyten belegt wurde. Folglich betrüge die Lebensdauer von WHV-infizierten Hepatozyten in den Waldmurmeltieren drei bis fünf Wochen. Wenn nun der Verlust der cccDNA nur durch den Tod der infizierten Zellen vorangetrieben würde, käme der cccDNA-Eliminationsprozess insgesamt sehr langsam voran (Moraleda et al. 1997). So würde eine sechs- bis zwölfmonatige vollständige Inhibition der cccDNA-Synthese bei einer Hepatozytenlebensdauer von drei bis fünf Wochen lediglich zu einer 1000-fachen Abnahme der cccDNA-Menge führen. Somit läge immer noch eine substantielle Menge cccDNA infizierter Hepatozyten vor.

Bezieht man die Berechnungen von Moraleda et al. auf die Daten dieser Arbeit, so wäre es nicht möglich gewesen, eine cccDNA-Reduktion bis unterhalb der NWG bei neun von 20 Patienten allein durch die Elimination infizierter Leberzellen zu erreichen.

5.8. Intrazelluläre HBV-DNA

Die intrazelluläre HBV-DNA, die als teilweise doppelsträngiges Molekül in Nukleokapsiden im Zytoplasma vorkommt, wird zum einen als Virion verpackt aus der infizierten Zelle ausgeschleust, zum anderen speist diese HBV-DNA den intranukleären cccDNA-Pool (Tuttleman et al. 1986). Die Hemmung der viralen Polymerase im Zytoplasma der infizierten Hepatozyten durch die antivirale Kombinationstherapie reduziert die Produktion intrazellulärer HBV-

DNA. Da diese das Vorläufermolekül der cccDNA ist, sollte folglich auch die Konzentration der intranukleären cccDNA absinken (Nicoll et al. 1998; Delmas et al. 2002).

Initial lag die mittels des quantitativen PCR-Verfahrens gemessene intrazelluläre HBV-DNA in einem Bereich von 10,22 Kopien/Zelle bis zu 12703,81 Kopien pro Zelle. Chen et al. (Chen 2004) konnten ähnliche Werte mit ihrem PCR-Verfahren nachweisen. Nach 48-wöchiger Kombinationstherapie hatte die Menge der intrazellulären HBV-DNA bei 18/20 Patienten signifikant abgenommen, die mediane Reduktion betrug 99%.

Köck et al. (Köck 2003) hatten in ihrer Studie versucht, durch frühzeitige Inhibition der viralen Polymerase durch Nukleos(t)idanaloga, die Produktion intrazellulärer HBV-DNA und folglich die Etablierung des Virus in den Zellen zu verhindern. Mit dieser Methode wurde zwar eine deutliche Reduktion der intrazellulären HBV-DNA erreicht, es zeigte sich aber, dass eine geringe Menge der Virus-DNA nicht durch die eingesetzten Medikamente eliminiert wurde.

Cacciola et al. (Cacciola et al. 2000) empfahlen in ihrer Studie, die Quantifizierung der intrazellulären HBV-DNA dazu zu nutzen, um das Risiko einer möglichen Reaktivierung der Hepatitis B Infektion bei einem Absetzen der antiviralen Medikamente voraussagen zu können. Intrazelluläre HBV-DNA könnte theoretisch über einen längeren Zeitraum als Nukleokapsid verpackt eine Therapie überdauern. Des Weiteren kann die Suche nach geringen Mengen intrazellulärer HBV-DNA „okkulte“ HBV-Infektionen aufdecken (Cacciola et al. 1999).

Die Wirksamkeit des eingesetzten Therapieregimes auf die intrazelluläre HBV-DNA konnte in dieser Studie nachgewiesen werden. Interessant war, dass bei drei der vier Patienten, die eine HBsAg-Serokonversion durchgemacht hatten, noch residuelle Mengen intrazellulärer HBV-DNA nachzuweisen waren, was zu der Vermutung führte, dass entweder einige in Nukleokapside verpackte HBV-DNA-Moleküle die antivirale Therapie überdauert hatten oder dass weiterhin intranukleäre cccDNA vorhanden und transkriptionell aktiv war. Diese Beobachtung entspricht den oben beschriebenen Ergebnissen früherer Untersuchungen. In diesen Studien waren nach der serologischen Ausheilung

ebenfalls noch Spuren des Hepatitis B-Virus in den infizierten Lebern gefunden worden (Cacciola et al. 1999; Cacciola et al. 2000; Yuen 2004).

5.9. Serum-HBV-DNA, intrazelluläre HBV-DNA und cccDNA

Mommeja-Marin et al. (Mommeja-Marin 2003) hatten in ihrer Studie die Serum-HBV-DNA als wichtigen Therapiemarker deklariert. Sie konnten signifikante Korrelationen zwischen dem Serum-Virus-Titer, der Reduktion des Serum-Virus-Titers, dem histologischen Grading sowie dem biochemischen und serologischen Ansprechen nachweisen. Für den Serum-HBV-DNA-Titer als Therapiemarker spricht zum einen die unkomplizierte quantitative Bestimmung desselben aus einer Serumprobe der Patienten. Zum anderen wurde durch neue Quantifizierungsmethoden die dynamische Breite der Assays verbessert, so dass die Reduktion der Serum-HBV-DNA bis zu einer NWG von 100 Kopien/ml bestimmt werden kann. Des Weiteren postulierte Mommeja-Marin, dass die Reduktion des Serum-HBV-DNA-Titers die Effizienz der eingesetzten antiviralen Therapie widerspiegelt und stellte die Hypothese auf, dass der Serum-HBV-DNA-Titer die intrazelluläre HBV-DNA-Replikation widerspiegelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei HBeAg positiven Patienten ein höherer Serum-Virus-Titer vorlag als bei Anti-HBe positiven Patienten und dass die Konzentration der intrazellulären HBV-DNA bei HBe positiven Patienten ebenfalls höher war. Tatsächlich zeigten die o. g. Daten, dass Anti-HBe positive/HBeAg negative Patienten nur ein Prozent der Serum-HBV-DNA-Konzentration von HBeAg positiven Patienten aufweisen (Anti-HBe positiv: 3×10^5 Kopien/ml im Median, HBeAg positiv: 3×10^7 Kopien/ml im Median). Zum anderen geht aus den Daten hervor, dass die mediane Reduktion der Serum-HBV-DNA, der intrazellulären HBV-DNA und der cccDNA proportional ist. Sie betrug bei der Serum-HBV-DNA im Median 99,99%, bei der intrazellulären HBV-DNA im Median 99,26% und bei der cccDNA im Median 96,58%. Die vorliegenden Ergebnisse finden ihre Entsprechung in den Untersuchungen von Werle-Lapostolle (Werle-Lapostolle 2004). Auch in ihrer Studie nahmen die Konzentrationen wie folgt ab: Serum-HBV-DNA > intrazelluläre HBV-DNA > cccDNA.

5.10. Histologische Veränderungen

Die entnommenen Leberbiopsien wurden von Pathologen (Institut für Pathologie, UKE) histologisch untersucht. Es wurde der Entzündungsgrad sowie das Fibrosestadium bestimmt. Nach 48-wöchiger Therapie hatte sich der Entzündungsgrad bei neun von 20 Patienten verbessert, bei zehn war er gleich geblieben, bei einem Patienten hatte er sich verschlechtert. Das Fibrosestadium verbesserte sich unter Therapie bei sechs Patienten um ein Stadium, bei zwei Patienten um zwei Stadien. Bei zehn Patienten blieb das Fibrosestadium konstant, bei zwei Patienten wurde abschließend eine Fibroseprogression nachgewiesen.

Eine Korrelation zwischen initialem Grading und Staging bestand nicht, was bestätigte, dass die Aktivität der Leberentzündung, nachweisbar im Entzündungsgrad, im Verlauf einer Hepatitis B-Erkrankung deutlichen Schwankungen unterliegt.

Mommeja-Marin et al. (Mommeja-Marin 2003) bemängelten in ihrer Studie bereits die geringe dynamische Breite der histologischen Begutachtung, so dass nur grobe Veränderungen sichtbar gemacht würden. Diese Aussagen treffen auch auf diese Arbeit zu.

Der zur Klassifizierung der Leberhistologien benutzte METAVIR-Score unterteilt lediglich zwischen Mottenfraßnekrose, intralobulärer- und Brückennekrose sowie Entzündungen im Bereich der Portalfelder. Je nachdem, wie häufig die jeweiligen Veränderungen auftraten und für wie schwerwiegend sie der begutachtende Pathologe hielt, wurden sie mit Hilfe eines Algorithmus in lediglich vier Entzündungsgrade (A0 bis A3, keine bis starke Aktivität) eingeteilt. Zur Klassifizierung der Fibrosestärke standen fünf Stadien zur Verfügung (F0: keine Fibrose bis F4: Leberzirrhose).

Das Hepatitis B-Virus ist für sich genommen nicht zytopathogen. Die immunologische Reaktion des Wirts auf die HBV-Infektion stellt die eigentliche Erkrankung dar, der histologische Schaden ist die Folge dieser Erkrankung. Eine Reduktion der Virusreplikation müsste somit auch mit verbesserter Leberhistologie einhergehen. Da in dieser Studie bei fast allen Patienten unter Therapie sowohl die intrazelluläre als auch die Serum-HBV-DNA und bei 14 von

20 Patienten die intranukleäre cccDNA abnahmen, wäre eine histologische Verbesserung bei vielen Patienten erwartet worden. Der Entzündungsgrad verbesserte sich bei neun Patienten (45%), und bei acht Patienten (40%) reduzierte sich das Fibrosestadium. Insgesamt profitierten 13 der 20 Patienten mit gepaarter Leberbiopsie bezüglich einer histologischen Verbesserung. Warum diese Zahl trotz der kompetenten Kombinationsbehandlung relativ gering ausfiel, liegt zum einen in der bereits oben beschriebenen geringen dynamischen Breite des METAVIR-Scores. Zum anderen war der zeitliche Abstand zwischen beiden Leberbiopsien möglicherweise zu kurz, um die Reduktion der Entzündungsreaktion und der fibrotischen Veränderungen durch die Abnahme der infizierten Leberzellen und Zunahme der Leberzellregeneration sichtbar machen zu können. Weitere Fehlerquellen einer Leberbiopsie, die die Aussagefähigkeit bei einer relativ kleinen Patientenkohorte einschränken, sind die Größe des Stanzzyinders bzw. die Zahl der getroffenen Portalfelder sowie die mögliche Inhomogenität der entzündlichen und fibrotischen Veränderungen innerhalb der Leber.

Serielle Leberbiopsien werden aufgrund ihrer Invasivität und den damit verbundenen Risiken auch in Zukunft keine Routineuntersuchungen von Patienten darstellen. Bravo et al. (Bravo 2001) postulierten in ihrer Studie, dass die Leberbiopsieentnahme nicht häufiger als ein Mal pro Jahr durchgeführt werden sollte.

Die jetzt zur Verfügung stehende quantitative Echtzeit-PCR-Methode zur Quantifizierung der intrahepatozellulären cccDNA und HBV-DNA rückt die Leberbiopsieentnahme jedoch in ein neues Licht. Ein serielles Routine-Monitoring der cccDNA scheint zum jetzigen Zeitpunkt zwar nicht praktikabel zu sein, dennoch könnte die quantitative cccDNA-Messung in Zukunft möglicherweise Therapieendpunkte determinieren. Wenn es gelingt, die Konzentration der cccDNA zu bestimmen, bei der eine wirksame Kontrolle der chronischen HBV Infektion durch das Wirtsimmunsystem einsetzt, könnte durch diese Biopsie möglicherweise der Zeitpunkt für die Beendigung einer Langzeittherapie determiniert werden. Bis es soweit ist, werden weitere Langzeitstudien nötig sein, die die Rolle der cccDNA für die klinische Heilung der HBV-Infektion in Verbindung mit immunologischen Reaktionen auf die chronische HBV-Infektion untersuchen.

6. Zusammenfassung

Hepatitis B Virus (HBV) covalently closed circular (ccc) DNA stellt die episomale replikative Intermediärform für die persistierende HBV Infektion, lokalisiert in Hepatozyten, dar. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Quantifizierung von intrazellulärer cccDNA aus Leberbiopsien von chronisch HBV infizierten Patienten vor und nach Beendigung einer 48 wöchigen antiviralen Kombinationstherapiestudie. Intrahepatische cccDNA Spiegel wurden mit Hilfe einer Echtzeit-PCR quantifiziert und mit biochemischen, virologischen, serologischen und histologischen Parametern korreliert. cccDNA konnte in allen Patientenbiopsien detektiert werden. Die 48-wöchige antivirale Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon alpha und dem Nukleotidanalogen Adefovirdipivoxil resultierte in einem signifikanten Abfall der cccDNA Kopienanzahl/Zelle, zum Teil bis unter die Nachweisgrenze. Dieser Abfall korrelierte positiv mit der Reduktion von HBsAg und mit der Menge an Gesamtintrazellulärer HBV-DNA und Serum-HBV-DNA sowie partiell mit histologischen Parametern und zeigt, dass transkriptionell aktive cccDNA reduziert wurde. Die Reduktion der cccDNA erfolgte vermutlich primär über nichtzytolytische Mechanismen. Obwohl die Quantifizierung von cccDNA aus wiederholten Biopsien für Patienten keine Routinemessung darstellen kann, so könnte die Bestimmung von cccDNA als möglicher Endpunkt einer antiviralen Therapie zukünftig von großem therapeutischem Nutzen sein.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Adachi, H., S. Kaneko, et al. (1992). "Clearance of HBsAg in seven patients with chronic hepatitis B." *Hepatology* 16(6): 1334-1337.
- 2 Addison, W. R., Walters, K.-A., Wong, W. W., S., Wilson, J. S., Madej, D., Jewell, L. D., and D. Lorne J. Tyrrell (2002). "Half-Life of Duck Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Pool in Vivo following Inhibition of Viral Replication." *J Virol* 76(12): 6356-6363.
- 3 Balzarini, J., Naesens, L., Herdewijn, P., Rosenberg, I., Holy, A., Pauwels, R., Baba, M., et al. (1989). "Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 332-336.
- 4 Bancroft, W. H., F. K. Mundon, et al. (1972). "Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen." *J Immunol* 109(4): 842-848.
- 5 Bock, C. T., Schranz, P., Schroder, C.H., and Zentgraf, H. (1994). "Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell." *Virus Genes* 8: 215-229.
- 6 Boni, C., A. Bertoletti, et al. (1998). "Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B." *J Clin Invest* 102(5): 968-975.
- 7 Boni, C., A. Penna, et al. (2001). "Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy." *Hepatology* 33(4): 963-971.
- 8 Bowden, S., Jackson, K., Littlejohn, M., and S. Locarnini (2004). "Quantification of HBV Covalently Closed Circular DNA from Liver Tissue by Real-Time PCR." *Methods in Molecular Medicine*, vol. 95: Hepatitis B and D Protocols, volume 1 (Edited by: R. K. Hamatake and J. Y. N. Lau (c) Humana Press Inc. Totowa, NJ 95 (1): 41-50.
- 9 Bravo, A. A., Sheth, S. G., Chopra, S. (2001). "Liver biopsy." *N Engl J Med* 334: 495-500.
- 10 Bruss, V. and D. Ganem (1991). "The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 1059-1063.

- 11 Buckwold, V. E., Z. Xu, et al. (1996). "Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication." *J Virol* 70(9): 5845-5851.
- 12 Cacciola, I., Polliciono, T., Squadrito, G., Cerenzia, G., Orlando, M. E., Raimondo, G. (1999). "Occult Hepatitis B Virus Infection in Patients with chronic Hepatitis C Liver Disease." *N Engl J Med* 341(1): 22-26.
- 13 Cacciola, I., Polliciono, T., Squadrito, G., Cerenzia, G., Villari, D., De Franchis, R., Santantonio, T., Brancatelli, S., Colucci, G., Raimondo, G. (2000). "Quantification of Intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) DNA in Patients with chronic HBV Infection." *Hepatology* 31(2): 507-512.
- 14 Castells, L., V. Vargas, et al. (2002). "Clinical impact and efficacy of lamivudine therapy in de novo hepatitis B infection after liver transplantation." *Liver Transpl* 8(10): 892-900.
- 15 CDC (1985). "Recommendations for protection against viral hepatitis. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)." *MMWR* 34: 313-335.
- 16 CDC (1988). "Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus: prenatal screening of all pregnant women for hepatitis B surface antigen. Recommendation of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)." *MMWR* 37: 341-346.
- 17 CDC (1991). "Hepatitis B Virus: a comprehensive strategy for limiting transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)." *MMWR* 40(RR-13): 1-25.
- 18 Chang, T. T., Lai, C. L., Liaw, Y. F., Guan, R., Lim, S. G., Lee, C. M., Ng, K. Y., et al. (2000). "Incremental increases in HBeAg seroconversion and continued ALT normalization in Asian chronic HBV (CHB) patients treated with lamivudine for four years (abstract)." *Antiviral Therapy* 5 (Suppl 1): 44.
- 19 Chen, Y., Sze, J., He, M.-L. (2004). "HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage." *World J Gastroenterol.* 10(1): 82-85.

- 20 Civitico, G. M., and Locarnini, S. A. (1994). "The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocyte cultures." *Virology* 203: 81-89.
- 21 Dandri, M., M. R. Burda, et al. (2000). "Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA." *Hepatology* 32(1): 139-146.
- 22 Dean, J., Bowden, S., and Locarnini, S. (1995). "Reversion of duck hepatitis B virus DNA replication in vivo following cessation of treatment with the nucleoside analogue ganciclovir." *Antiviral Res* 27: 171-178.
- 23 Delmas, J., O. Schorr, et al. (2002). "Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro." *Antimicrob Agents Chemother* 46(2): 425-433.
- 24 Dhedin, N., C. Douvin, et al. (1998). "Reverse seroconversion of hepatitis B after allogeneic bone marrow transplantation: a retrospective study of 37 patients with pretransplant anti-HBs and anti-HBc." *Transplantation* 66(5): 616-619.
- 25 Dienstag, J. L., Perrillo, R. P., Schiff, E. R., Bartholomew, M., Vicary, C., and M. Rubin (1995). "A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection." *N Engl J Med* 333: 1266-1273.
- 26 Dienstag, J. L., E. R. Schiff, et al. (1999). "Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States." *N Engl J Med* 341(17): 1256-1263.
- 27 Foster, S. A., Cherny, J., Cheng, Y. C. (1991). "Herpes simplex virus-specified DNA polymerase is the target for the antiviral action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine." *J Biol Chem* 266: 238-244.
- 28 Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charney, P. (1979). "Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*." *Nature* 281: 645-650.
- 29 Ghandi, M. J., Yang, G. G., McMahon, B., Vyas, G. (2000). "Hepatitis B virions isolated with antibodies to the Pre-S1 domain reveal occult viremia in surface antigen negative/antibody-positive carriers by polymerase chain reaction." *Transfusion* 40: 910-916.

- 30 Guidotti, L. G., C. M. Eggers, et al. (1999). "In vivo regulation of hepatitis B virus replication by peroxisome proliferators." *J Virol* 73(12): 10377-10386.
- 31 Guidotti, L. G., R. Rochford, et al. (1999). "Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection." *Science* 284(5415): 825-829.
- 32 Guo, J. T., H. Zhou, et al. (2000). "Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections." *J Virol* 74(3): 1495-1505.
- 33 Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, et al. (2003). "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B." *N Engl J Med* 348(9): 800-807.
- 34 Heathcote, E. J., Jeffers, L., Wright, T., Sherman, M., Perrillo, R., Sacks, S., Carithers, R., et al. (1998). "Loss of serum HBV DNA and HBeAg and seroconversion following short term (12 weeks) adefovir dipivoxil therapy in chronic hepatitis B: two placebo controlled phase II studies (abstract)." *Hepatology* 28(317A).
- 35 Jilbert, A. R., Wu T.-T., England, J. M., Hall, P. M., Carp, N. Z., O'Connell, A. P., and W. S. Mason (1992). "Rapid resolutions of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement." *J Virol* 66: 1377-1388.
- 36 Kajino, K., A. R. Jilbert, et al. (1994). "Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte." *J Virol* 68(9): 5792-5803.
- 37 Köck, J., Baumert, T. F., Delaney IV, W. E., Blum, H. E., von Weizäcker, F. (2003). "Inhibitory Effect of Adefovir and Lamivudine on the Initiation of Hepatitis B Virus Infection in Primary Tupaia Hepatocytes." *Hepatology* 38(6): 1410-1418.
- 38 Kock, J., Theilmann, L., Galle, P., and Schlicht, H. J. (1996). "Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus." *Hepatology* 23: 405-413.

- 39 Lai, C. L., R. N. Chien, et al. (1998). "A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group." *N Engl J Med* 339(2): 61-68.
- 40 Lau, G. K., R. Liang, et al. (1997). "Hepatic events after bone marrow transplantation in patients with hepatitis B infection: a case controlled study." *Bone Marrow Transplant* 19(8): 795-799.
- 41 Lau, J. Y., N., and Wright, T. L. (1993). "Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B." *Lancet* 342: 1335-1340.
- 42 Lee, W. M. (1997). "Hepatitis B virus infection." *N Engl J Med* 337(24): 1733-1745.
- 43 Leung, N. W. Y., Lai, C. L., Chang, T. T., Guang, R., Lee, C. M., Ng, K. Y., Wu, P. C., et al. (2001). "Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after three years of therapy." *Hepatology* 33: 1527-1532.
- 44 Lewin, S. R., R. M. Ribeiro, et al. (2001). "Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed." *Hepatology* 34(5): 1012-1020.
- 45 Liaw, Y. F., Leung, N. W. Y., Chang, T. T., Guan, R., Tai, D. I., Ng, K. Y., Chien, R. N., et al (2000). "Effects on extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B." *Gastroenterology* 119: 172-180.
- 46 Liaw, Y. F., Sheen, I.S., Chen, T. J., Chu, C. M., Pao, C.C. (1991). "Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study." *Hepatology* 13: 627-631.
- 47 Locarnini, S. and C. Birch (1999). "Antiviral chemotherapy for chronic hepatitis B infection: lessons learned from treating HIV-infected patients." *J Hepatol* 30(3): 536-550.
- 48 Locarnini, S. A., Civitico, G. M., and Newbold, J. E. (1996). "Hepatitis B: new approaches for antiviral chemotherapy." *Antiviral Chemistry Chemotherapy* 7: 1-12.
- 49 Lok, A. S. and B. J. McMahon (2001). "Chronic hepatitis B." *Hepatology* 34(6): 1225-1241.

- 50 Lok, A. S.-F., Chan, H. L.-Y. (2000). "Viral hepatitis B and D,." *Comprehensive Clinical Hepatology* (O'Grady, J. G., Lake, J. R., and Howdle, P.D., eds.), Mosby, London: pp 12.1-22.
- 51 Marcellin, P., T. T. Chang, et al. (2003). "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B." *N Engl J Med* 348(9): 808-816.
- 52 Margolis, H. S., M. J. Alter, et al. (1991). "Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control." *Semin Liver Dis* 11(2): 84-92.
- 53 Mason, A. L., Xu, L., Guo, L., Kuhns, M., and Perrillo, R. (1998). "Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen." *Hepatology* 27: 1736-1742.
- 54 Mason, W. S., Averett, D., Pugh, J., Kajino, K., Cullen, J., Fourel, I., and A. Jilbert (1996). "Antiviral therapy for chronic hepadnavirus infections." *Antiviral Therapy* 1: 129-141.
- 55 McMahon, B. J., P. Holck, et al. (2001). "Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus." *Ann Intern Med* 135(9): 759-768.
- 56 Miller, R. H. and W. S. Robinson (1984). "Hepatitis B virus DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver." *Virology* 137(2): 390-399.
- 57 Miyanohara, A., Imamura, T., Araki, M., Sugawara, K., Ohtomo, N., Matsubara, K. (1986). "Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Synthesis of two polypeptides translated from different initiation codon." *J Virol* 59: 176-180.
- 58 Mommeja-Marin, H., Mondou, E., Blum, M. R., and Franck Rousseau (2003). "Serum HBV DNA as a Marker of Efficacy During Therapy for Chronic HBV Infection: Analysis and Review of the Literature." *Hepatology* 37: 1309-1319.
- 59 Moraleda, G., J. Saputelli, et al. (1997). "Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus." *J Virol* 71(12): 9392-9399.

- 60 Neurath, A. R., Kent, S. B., Strick, N., Parker, K. (1986). "Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on the hepatitis B virus." *Cell* 46: 429-436.
- 61 Newbold, J. E., H. Xin, et al. (1995). "The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes." *J Virol* 69(6): 3350-3357.
- 62 Nicoll, A. J., D. L. Colledge, et al. (1998). "Inhibition of duck hepatitis B virus replication by 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, an acyclic phosphonate nucleoside analogue." *Antimicrob Agents Chemother* 42(12): 3130-3135.
- 63 Nowak, M. A., Bonhoeffer, S., Hill, M., Boehme, R., Thomas, H. C., and H. McDade (1996). "Viral dynamics in hepatitis B virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4398-4402.
- 64 Perrillo, R., Schiff, E., Yoshida, E., Statler, A., Hirsch, K., Wright, T., Gutfreund, K., et al. (2000). "Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants." *Hepatology* 32: 129-134.
- 65 Rehmann, B., C. Ferrari, et al. (1996). "The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response." *Nat Med* 2(10): 1104-1108.
- 66 Scaglioni, P. P., M. Melegari, et al. (1997). "Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame." *Virology* 233(2): 374-381.
- 67 Schalm, S. W., Heathcote, J., Cianciara, J., Farrell, G., Sherman, M., Willems, B., Dhillon, A., et al. (2000). "Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomized trial." *Gut* 46: 562-568.
- 68 Seeger, C. and W. S. Mason (2000). "Hepatitis B virus biology." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 51-68.
- 69 Summers, J., A. R. Jilbert, et al. (2003). "Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11652-11659.

- 70 Summers, J., Mason, W. S. (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of a RNA intermediate." *Cell* 29: 403-415.
- 71 Summers, J., Smith, P. M., Horwich, A. L. (1990). "Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification." *J. Virol* 64: 2819-2824.
- 72 Thimme, R., S. Wieland, et al. (2003). "CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection." *J Virol* 77(1): 68-76.
- 73 Tsiang, M., Gibbs, C. (2004). "Analysis of HBV dynamics and its impact on antiviral development." Lau, J. Y. N., Hamatake, R., eds. *Methods in molecular medicine: hepatitis B protocols*. Humana Press. Im Druck.
- 74 Tsiang, M., J. F. Rooney, et al. (1999). "Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy." *Hepatology* 29(6): 1863-1869.
- 75 Tuttleman, J. S., C. Pourcel, et al. (1986). "Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells." *Cell* 47(3): 451-460.
- 76 Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney, W.E., Xiong, S., Brosgart, C. L., Chen, S-S., Gibbs, C., Zoulim, F. (2004). "New insight on Viral cccDNA Persistence During the Natural History of Chronic Hepatitis B and Adefovir dipivoxil Therapy." *Gastroenterology* 126: 1750-1758.
- 77 Wu, T. T., L. Coates, et al. (1990). "In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway." *Virology* 175(1): 255-261.
- 78 Xiong, X., Flores, C, Yang, H., toole, J. J., Gibbs, C. S.. (1998). "Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro." *Hepatology* 28: 1669-1673.

- 79 Yokosuka, O., M. Omata, et al. (1985). "Changes of hepatitis B virus DNA in liver and serum caused by recombinant leukocyte interferon treatment: analysis of intrahepatic replicative hepatitis B virus DNA." *Hepatology* 5(5): 728-734.
- 80 Yuen, M.-F., Wong, D. K.-H., Sablon, E., Tse, E., Ng, I. O.-L., Yuan, H.-J., Siu, C.-W., Sander, T. J., Bourne, E. J., Hall, J. G. , Condreay, L. D., and Ching-Lung Lai (2004). "HBsAg Clearance in Chronic Hepatitis B in the Chinese: Virological, Histological, and Clinical Aspects." *Hepatology* 39(6): 1694-1700.
- 81 Zhang, Y. Y., B. H. Zhang, et al. (2003). "Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12372-12377.
- 82 Zhu, Y., Yamamoto, T., Cullen, J., Saputelli, J., Aldrich, C. E., Miller, D. S., Litwin, S., Furman, P. A., Jilbert, A. R., Mason, W. S. (2001). "Kinetics of Hepadnavirus Loss from the Liver during Inhibition of Viral DNA Synthesis." *J Virol* 75(1): 311-322.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Hepatitis B Virus_____	7
Abbildung 2: Infektions- und Reproduktionszyklus des HBV_____	9
Abbildung 3: Schema des Studienablaufs_____	23
Abbildung 4: Übersicht über die Methode der PCR-Amplifikation_____	30
Abbildung 5: Biochemische Parameter im Vergleich Woche 0 und 48_____	39
Abbildung 6: Serologische Parameter im Vergleich Woche 0 und 48_____	40
Abbildung 7: Serum-HBV-DNA im Vergleich Woche 0 und 48_____	42
Abbildung 8: Histologisches Grading im Vergleich Woche 0 und 48_____	44
Abbildung 9: Histologisches Staging im Vergleich Woche 0 und 48_____	45
Abbildung 10: Intrazelluläre HBV-DNA im Vergleich Woche 0 und 48_____	49
Abbildung 11: HBsAg-Standardkurve_____	51
Abbildung 12: HBsAg im Serum im Vergleich Woche 0 und 48_____	57
Tabelle 1: Übersicht über die experimentell ermittelten Daten_____	37/38
Tabelle 2: cccDNA im Vergleich Woche 0 und Woche 48_____	47
Tabelle 3: HBsAg-Standard Evaluationsdaten_____	53
Tabelle 4: Evaluationsdaten zur Patientenserumverdünnung (Teil 1)_____	55

9. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ALT: Alanin-Amino-Transferase (Enzym in der Leberzelle)

anti-HBc: Antikörper gegen das Hepatitis B core Antigen

anti-HBe: Antikörper gegen das Hepatitis B envelope Antigen

anti-HBs: Antikörper gegen das Hepatitis B surface Antigen

cccDNA: covalently closed circular DNA, kovalent zirkulär geschlossene DNA

bp: Basenpaare

DHBV: Duck Hepatitis B Virus

DNA: Desoxyribonukleinsäure

Ge: Genomäquivalent

HBcAg: Hepatitis B core Antigen

HBeAg: Hepatitis B envelope Antigen

HBsAg: Hepatitis B surface Antigen

HBV: Hepatitis B Virus

HCC: Hepatozelluläres Karzinom (Hepatocellular carcinoma)

IFN- α : Interferon alpha

log: Logarithmus

NWG: Nachweisgrenze

ORF: Open reading frame = offener Leserahmen

RNA: Ribonukleinsäure

TH1-Antwort: T-Helferzellantwort Typ 1

ULN: Upper Limit Normal

WHV: Woodchuck (Waldmurmeltier) Hepatitis Virus

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Jörg Petersen, der mir die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Dissertation gab und mich bei der Planung der Experimente und bei der Gestaltung der Dissertation unterstützte.

Herrn Dr. med. Karsten Wursthorn möchte ich danken für seine geduldige Hilfe in allen Abschnitten des gemeinsamen Arbeitens und für die stets freundliche Atmosphäre in der AG Hepatologie und Zelltransplantation.

Bei Frau Urte Matschl und Frau Dr. Maura Dandri möchte ich mich für die täglichen praktischen Hilfestellungen bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Hochschulambulanz für Innere Medizin und der Abteilung für Sonographie der Medizinischen Klinik I, ohne die die zahlreichen Blut- und Leberbiopsieentnahmen nicht möglich gewesen wären.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich danken für die liebevolle, moralische und auch finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Frauke Metzler
Geburtsdatum	20.01.1976
Geburtsort	Aurich
Aktuelle Adresse	Hartwig-Hesse-Str. 10 20257 Hamburg
Telefon	0170 3116997
e-mail	frauke.metzler@hamburg.de

Schulische Ausbildung

1982-1986	Grundschule, Norden
1986-1988	Orientierungsstufe, Norden
1988-1995	Gymnasium, Norden (Abitur)

Berufliche Ausbildung

Oktober 1995 - Juni 2002	Studium der Humanmedizin, Universitätsklinikum Hamburg (Staatsexamen)
-----------------------------	--

Ärztliche Tätigkeit

November 2002 - April 2004	Ärztin im Praktikum, Universitätsklinikum Hamburg
Mai 2004	Approbation als Ärztin
Seit Mai 2004	Wissenschaftliche Mitarbeit in der AG Hepatologie und Zelltransplantation von Herrn PD Dr. J. Petersen, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg

Promotion

Mai 2003 - Oktober 2004	AG Hepatologie und Zelltransplantation (Herrn PD Dr. J. Petersen), Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg
----------------------------	---

Hamburg, 25.10.04

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 12. 2004

1. Gutachter: PD. Dr. J. Petersen
2. Gutachter: PD. Dr. B. Zöllner
3. Gutachter: Prof. Dr. H. Will