

**Die intrahepatische Expression von Interferon γ und Tumor
Nekrose Faktor α und das Ansprechen auf eine Interferon-
Therapie bei chronischer Hepatitis C-Infektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ulrike Becker geb. Wennrich
aus Frankfurt am Main

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Franz-Ludwig Dumoulin
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bertfried Matz

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.03.2010

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Bonn
Direktor Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Vorwort.....	11
I. Einleitung.....	12
1 Chronische Hepatitis C Virus-Infektion.....	12
1.1 Virologie.....	12
1.2 Epidemiologie.....	15
1.3 Histopathologie.....	17
1.4 Klinik und Verlauf.....	19
1.5 Antivirale Immunantwort.....	20
1.5.1 Humorale Immunantwort.....	22
1.5.2 Zelluläre Immunantwort.....	22
1.6 Zytokine.....	22
1.7 Chronische versus selbstlimitierende Hepatitis C-Infektion.....	24
2 Hepatitis C Virus – spezielle Aspekte.....	27
2.1 Therapie und Prävention.....	27
2.1.1 Aktuelle Therapie und Wirkungsweise.....	27
2.1.2 Mögliche Ursachen einer Therapieresistenz.....	30
2.1.3 Neuere Ansätze und Ausblick.....	32
2.1.4 Vakzine.....	33
2.1.5 Orthotope Lebertransplantation.....	34
2.2 Prädiktoren eines Therapieerfolges.....	34
3 Fragestellung.....	41
II. Material und Methoden	42
1 Patientencharakteristika.....	42
2 Diagnostik.....	44
2.1 Bestimmung der Viruslast.....	44
2.2 HCV-Typisierung.....	44
3 Therapieregime.....	45
4 Gewebeproben.....	45
5 RNA-Extraktion.....	46

5.1 Durchführung der RNA Extraktion.....	46
5.2 Entfernung möglicher Kontamination mit genomischer DNA	47
6 Polymerasekettenreaktion.....	48
6.1 Reverse Transkription.....	48
6.2 Prinzip der PCR.....	49
6.3 Sensitivität und Spezifität der PCR.....	52
6.4 Methodische Probleme der (semi-) quantitativen PCR.....	53
6.5 Vorteile der kompetitive (RT) PCR.....	54
6.6 Angewandte semiquantitative Methode.....	55
6.7 Durchführung.....	57
6.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.....	59
6.9 Auswertung.....	60
7 Statistik.....	61
III. Ergebnisse.....	63
1 Klinischer Therapieerfolg.....	63
2 Bedeutung verschiedener patientenseitiger, therapiebedingter und virologischer Faktoren für das Therapieansprechen.....	64
3 Bestimmung der intrahepatischen TNF α und IFN γ mRNA.....	67
3.1 Korrelation von TNF α mRNA-Werten mit dem Therapieansprechen.....	67
3.2 Korrelation von IFN γ mRNA-Werten mit dem Therapieansprechen.....	68
IV. Diskussion.....	69
1 Bedeutung von klinischen Faktoren auf das Therapieansprechen.....	70
2 Korrelation der intrahepatischen Zytokin mRNAs mit dem Therapieansprechen...	72
3 Mögliche Limitationen der Arbeit.....	77
V. Zusammenfassung.....	78
VI. Publikation.....	80
VI. Literaturverzeichnis.....	81
Danksagung.....	106

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
A-T	Adenosin-Thymidin
BT	breakthrough, Patienten, die unter der Interferon-Therapie einen negativen Hepatitis C Virusnachweis bieten, bei denen aber bereits vor Abschluss der Therapie wieder Viren mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden können
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Child	Stadieneinteilung der Leberzirrhose, wird nach ihrem Erfinder Child-Klassifikation genannt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d'ATP	Desoxyadenosintriphosphat
d'CTP	Desoxycytosintriphosphat
d'GTP	Desoxyguanintriphosphat
d'TTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinacid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Enzym, das DNA hydrolisiert
dNTP	Desoxynukleotid
et al.	und andere
ELISA	enzyme-linked immunoadsorbent assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ETR	end-of-treatment-response, Erfolgsrate bei Therapieende
Fa.	Firma
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GAPDH	Glyzerinaldehyd 3 phosphat Dehydrogenase
G-C	Guanin-Cytosin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HA	Hämophilie A
HB	Hämophilie B
HBV	Hepatitis B Virus

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCV-LP	hepatitis C virus-like particle, Hepatitis C Virus-ähnliche Partikel
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HVR	hypervariable Region
ICG R15	indocyanine green dye retention rate at 15 min, photometrischer Test um die Leberfunktion zu bestimmen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF-3	Interferon regulatory factor-3, Interferon- Regulations Faktor 3
ISDR	Interferon- α sensitivity determinig region, Interferon- α -Sensibilität-bestimmende Region
ISG	IFN- stimulierte Gene
IU	internationale Einheiten
i. v.	intravenös
ivDa	intravenöser Drogenabusus
JAK	Janus Kinase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mA	Milliampere
Mill.	Millionen
MIU	Millionen internationale Einheiten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NF-κB	Transkriptionsfaktor Nuclear Factor Kappa B

NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NR	non responder, Patienten die kein Ansprechen auf eine Interferon-Therapie zeigen, es kommt hier zu keiner Viruselimination
NYHA	ursprünglich von der „New York Heart Association“ veröffentlichtes Schema zur Einteilung von Herzkrankheiten
OD	optische Dichte
OP	Operation
PAMP	pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziiertes Molekularmuster
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG Interferon	pegyliertes Interferon
PIASs	protein inhibitors of activated STATs, Protein Inhibitoren der aktivierten STATs
PKR	double-stranded RNA-activated protein kinase, doppelsträngige RNA aktivierte Proteinkinase
PRR	pattern recognition receptor, Muster-erkennender-Rezeptor
PTPs	Protein Tyrosin Phosphatasen
RIG I	Retinoic acid-inducible gene-1, Retinsäure induzierbares Gen-1, Rezeptor des angeborenen Immunsystems
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Enzym, das RNA hydrolisiert
RP	relapse, Patienten, bei denen unter der Interferon-Therapie eine Viruselimination zu beobachten ist, die nach Abschluss der Therapie jedoch wieder einen positiven Virusnachweis bieten
rpm	rounds per minute, Drehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
-RT	reverse Transkription ohne das Enzym Reverse Transkriptase
RT-PCR	PCR mit vorheriger reverser Transkription

SHP2	Src-homology 2 containing protein-tyrosine phosphatase 2, SH2 enthaltende Protein Tyrosin Phosphatase 2
shRNA	vector-encoded short hairpin RNA, kurze Haarnadel RNS
siRNA	short interfering RNA, kleine behindernde RNS
SOCS	suppressor of cytokine signaling, Unterdrücker der Zytokinsignale
SVR	sustained virological responder, Patienten die auch noch 6 Monate nach Abschluss der Interferon-Therapie einen negativen Hepatitis C Virusnachweis haben
Stabw	Standardabweichung
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Tab.	Tabelle
TH1	Typ 1-Helfer-Zellen
TH2	Typ 2-Helfer-Zellen
TIFF	Tagged Image File Format, Dateiformat zur Speicherung von Bilddaten
TLR	Toll-like Receptor, Toll-artiger Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tyk	Tyrosin Kinase
UTR	untranslated regions, nicht translatierte Regionen im Genom des HCV
UV	Ultraviolett

Vorwort

Bei der Virushepatitis handelt es sich um eine diffuse Leberentzündung, die durch eine Infektion mit verschiedenen Viren ausgelöst werden kann. Der Großteil der Virushepatitiden wird durch 5 Viren, die mit den Großbuchstaben A bis E bezeichnet werden, verursacht. In den USA ist die Hepatitis C Virus-Infektion für ungefähr 40 % aller chronischen Lebererkrankungen verantwortlich, weltweit sind geschätzt 175 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Die Hepatitis C Virus-Infektion zeichnet sich durch eine hohe Chronifizierungsrate von über 60 % aus. Eine chronische Erkrankung führt häufig zu einer fortschreitenden Leberschädigung, die langfristig zur Entstehung einer Leberzirrhose und / oder eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen kann. In den letzten Jahren haben sich die Therapiemöglichkeiten einer chronischen HCV-Infektion deutlich verbessert. Während die zuerst durchgeführte Monotherapie mit Interferon α zu langfristigen Therapieerfolgen (Virusfreiheit auch 6 Monate nach der Behandlung) von ungefähr 20 % führte, konnten die Ansprechraten durch die zusätzliche Gabe von Ribavirin und die Einführung von pegyliertem (PEG) Interferon α weiter verbessert werden. Durch die aktuelle Standardtherapie der chronischen HCV Infektion mit PEG-Interferon α und Ribavirin kann bei über 50 % der Behandelten eine langfristige Viruselimination beobachtet werden. (Alter et al., 1995; American Gastroenterological Association, 2006; Fried et al., 2002; Lindsay, 1997).

Die Ursachen für eine Therapieresistenz sind unklar, es scheinen hier sowohl virale als auch wirtsspezifische Faktoren eine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene Prädiktoren bezüglich ihres Effektes auf die Effizienz einer Interferon α -Therapie untersucht. Zusätzlich wurden intrahepatische Zytokine bei Patienten, die auf eine antivirale Therapie ansprechen, und denen, die keinen oder nur einen geringen Therapieerfolg zeigen, untersucht und miteinander verglichen. Bisher gibt es aber nur wenige Arbeiten, die sich mit der Assoziation des prätherapeutischen intrahepatischen Zytokinexpressionsmusters und dem nachfolgenden Therapieergebnis beschäftigen.

Dies gab Anlass zu dieser Arbeit, die sich mit dem Einfluss der prätherapeutischen intrahepatischen Konzentration der mRNA der beiden Zytokine IFN γ und TNF α auf den Ausgang einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis C Virus-Infektion beschäftigt.

I. Einleitung

In den folgenden Kapiteln wird Grundsätzliches über das Hepatitis C Virus, Epidemiologie, Klinik und Verlauf der Erkrankung sowie histologische Veränderungen in der kranken Leber aufgezeigt. Weiterhin werde ich die Grundzüge der wirtseigenen Immunantwort darstellen und auf die beiden bei uns untersuchten Zytokine IFN γ und TNF α eingehen.

Der zweite Teil der Einleitung wird sich, auf diesen Grundlagen aufbauend, mit spezifischen Aspekten der Immunantwort bei chronischer und selbstlimitierender HCV-Infektion beschäftigen, und aktuelle Therapiemöglichkeiten und bisherige Forschungsergebnisse darstellen, um so die Grundlagen für diese Arbeit aufzuzeigen.

1 Chronische Hepatitis C Virus-Infektion

1.1 Virologie

Das Hepatitis C Virus wird zur Gruppe der Flaviviridae gezählt (Francki et al., 1991). Untersuchungen der Gensequenz zeigen eine große genetische Heterogenität des HCV. Zur Klassifikation wurde ein System, basierend auf der Analyse der Nukleotidsequenz der Core-, E1- und NS5-Region, etabliert, was zur Bestimmung von 6 verschiedenen Genotypen führte (1-6). Diese Genotypen können weiter in Subtypen aufgeteilt werden (Simmonds et al., 1994; Simmonds et al., 2005).

Der Viruspartikel mit einem Durchmesser zwischen 30 und 60 nm (He et al., 1987) besteht aus einer Hülle aus Wirtsmembranen, in welcher viruskodierte Glykoproteine (E1 und E2) liegen, die ein Nukleokapsid und ein positivsträngiges, einsträngiges RNA-Genom aus ungefähr 9.500 Nukleotiden umgeben (Choo et al., 1991).

Das Genom enthält hoch konservierte, nicht translatierte Regionen („untranslated regions“ = UTR's). Diese flankieren einen großen, offenen Leserahmen, der ein Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren verschlüsselt. Dieses Vorläuferprotein wird von zellulären und viralen Proteasen gespalten und es entstehen die Strukturproteine Core, E1 und E2, die im N-terminalen Bereich des Polyproteins liegen, ein kleines Membranprotein, p7, das vermutlich als Ionenkanal fungiert, und die Nicht-Strukturproteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B), die die intrazellulären Prozesse des viralen Lebenszyklus koordinieren (Lindenbach und Rice, 2005).

Genotyp	Subtyp	Auftreten
1	a	weit verbreitet in Nordeuropa und USA, assoziiert mit i.v.-Drogenmissbrauch
	b	weltweit häufigster Genotyp, häufiger bei älteren Infizierten
	c	
2	a,b,c	hauptsächlich bei älteren HCV-Infizierten aus dem Mittelmeerraum und dem Fernen Osten
	k	
3	a	weit verbreitet bei i.v.-Drogensüchtigen vor allem in Europa
	b	
	k	
4	a	weit verbreitet im Mittleren Osten, assoziiert mit medizinischer Behandlung
5	a	hauptsächlich in Süd-Afrika
6	a	bei i.v.-Drogensüchtigen in Hong Kong, Vietnam und Australien
	b	
	d	
	g	
	h	
	k	

Tab. 1: Aktuelle Genotypen und Subtypen mit Hauptrisikogruppen (Simmonds et al., 2005)

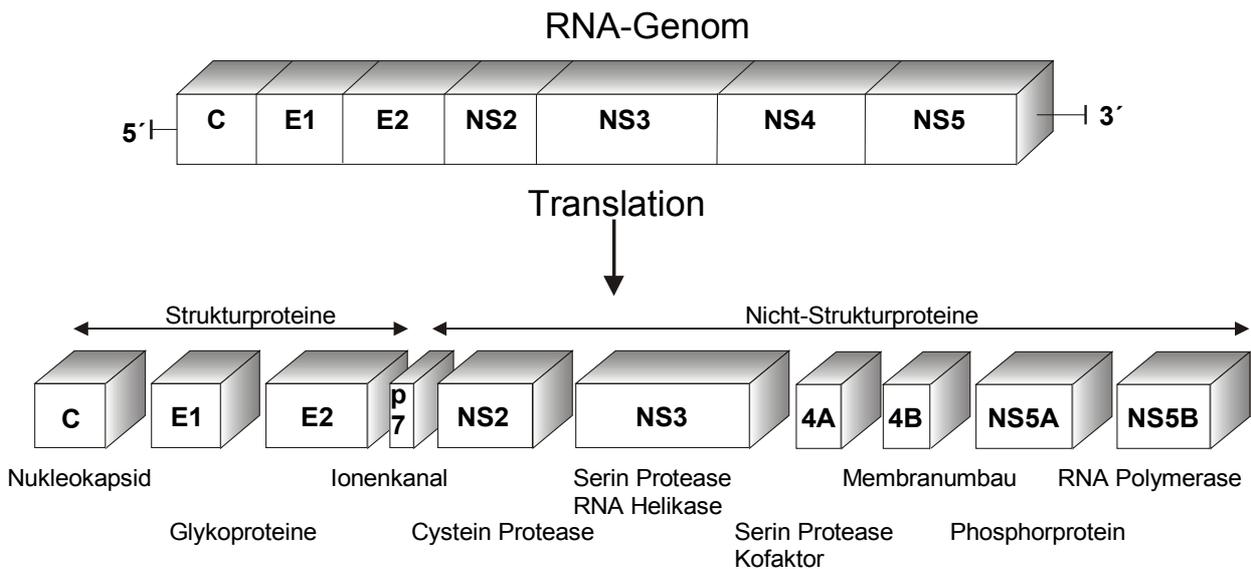


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Hepatitis C Virusgenoms (Lindenbach und Rice, 2005; Zeuzem et al., 1995)

Das Nukleokapsid (Core) ist hoch konserviert und immunogen, es enthält mehrere lineare B-Zell Epitope in der Nähe des N-Terminus, die häufig zur Antikörperbestimmung im Patientenserum benutzt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass das Core-Protein sowohl Apoptose fördert (Realdon et al., 2004; Ruggieri et al., 1997; Zhu et al., 1998) als auch den Anfang apoptotischen Zelltodes verhindern kann (Kawamura et al., 2006; Ray et al., 1996). Außerdem scheint das Core-Protein durch die Fähigkeit zur Veränderung der Transkription und Zellproliferation an der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) beteiligt zu sein (Akuta et al., 2007b; Moriya et al., 1998; Ray et al., 1996).

Die Glykoproteine E1 und E2, die die Hüllproteine repräsentieren, enthalten eine hydrophobe Sequenz, die wichtig für die Membranhftung ist (Pileri et al., 1998; Roccasecca et al., 2003). Lee et al. (2005) haben herausgefunden, dass E2 außerdem die Apoptose virusinfizierter Zellen blockiert. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, der die hohe Chronifizierungsrate der HCV-Infektion erklärt. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass E1 und / oder E2, möglicherweise in Verbindung mit dem Core-Protein, durch eine Unterdrückung der Apoptose zur Hepatokarzinogenese bei chronischer HCV-Infektion beitragen (Kamegaya et al., 2005).

Im Bereich des N-Terminus des E2-Proteins findet sich ein hoher Grad an Aminosäurevariationen, dieser Bereich wird als hypervariable Region 1 (HVR1)

bezeichnet. Die Aminosäuresequenz dieser Region ändert sich im Verlauf einer Infektion bei immunkompetenten Patienten und es gibt Hinweise, dass anti-HVR1-Antikörper an der Entstehung dieser Ausweichmutationen beteiligt sind (Booth et al., 1998; Kato et al., 1993; Mondelli et al., 1999; Weiner et al., 1992). Vieles spricht dafür, dass die Mutationen in der HVR1 eine Mitursache für die Persistenz des HCV im Verlauf einer akuten Infektion sind (Farci et al., 2000; Kato et al., 1993; Taniguchi et al., 1993). Möglicherweise hat die prätherapeutische Höhe der genetischen Heterogenität und ihr Verlauf unter der Therapie auch Einfluss auf das frühzeitige Ansprechen auf eine Interferon α -Therapie (Chambers et al., 2005; Farci et al., 2002).

Die NS2- und NS3-Region kodieren verschiedene Proteasen, das NS4A-Protein funktioniert anscheinend als Cofaktor für die NS3-Aktivität (Major und Feinstone, 1997). Die NS5-Region interagiert mit vielen Zellproteinen, sie hat ebenso wie E2 durch die Hemmung der Interferon-induzierten Protein-Kinase (PKR) Einfluss auf die Interferon-Resistenz verschiedener Virusstämme (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999). Mutationen in dieser Region führen vermutlich zu einer erhöhten Sensitivität des HCV-Genotyps 1b auf eine Interferon-Therapie (Chayama et al., 1997; Sarrazin et al., 1999). Möglicherweise spielt eine durch NS5A induzierte Aktivierung von STAT 3 eine Rolle bei der Auslösung einer akuten Hepatitis und der Entstehung des HCC, da STAT 3 einer der Hauptauslöser der Akut-Phase-Reaktion bei Lebererkrankungen ist und eine Rolle bei der Tumortransformation spielt (Gao, 2005). NS5B kodiert die RNA abhängige RNA-Polymerase, die sowohl „primer“-abhängig als auch „primer“-unabhängig die RNA Synthese initiieren kann (Lindenbach und Rice, 2005).

1.2 Epidemiologie

Das Hepatitis C Virus wurde zuerst 1989 von Choo et al. (1989) identifiziert. HCV ist bei 74-80 % der chronischen posttransfusionsbedingten non-A, non-B-Hepatitis nachweisbar (Kuhnl et al., 1990; Kuo et al., 1998). Heute ist die Hepatitis C Virus-Infektion eine der Hauptgründe der Posttransfusionshepatitis weltweit und eine der Hauptursachen für Lebererkrankungen im Endstadium (Kim, 2002). Sie kommt weltweit vor, mit einer niedrigen Prävalenz in den Vereinigten Staaten und Nordeuropa, einer höheren in Südostasien und der höchsten Prävalenz in der Ukraine und Zentralafrika

(Heintges und Wands, 1997). Die weltweite Prävalenz der chronischer HCV-Infektion liegt bei etwa 3 % (Alberti et al., 1999; Kim, 2002). Das HCV ist die Ursache für etwa 17 % der weltweiten Leberzirrhosen sowie für etwa 20 % der Fälle von hepatozellulärem Karzinom (HCC) (Kim, 2002). Die Virus-Infektion ist in den USA derzeit für etwa 8.000-10.000 Todesfälle jährlich verantwortlich mit zu erwartender Steigerung der Tendenz in den nächsten Jahren (Zein und Zein, 2002). In den USA ist es in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer Verdopplung der Fälle von hepatozellulärem Karzinom gekommen, wobei mindestens die Hälfte dieser Zunahme durch chronische HCV-Infektionen erklärt werden kann (El-Serag, 2007). Die HCV-assoziierte Leberzirrhose ist eine der wesentlichen Indikationen für die Durchführung einer Lebertransplantation. In den USA entstanden 1998 durch etwa 2,5 Millionen erkrankte Personen geschätzte direkte und indirekte Kosten in Höhe von 744 Millionen US \$ (Kim, 2002). Eine aktuelle Studie aus Spanien errechnet eine in den nächsten Jahren weiter zunehmende Mortalität, Morbidität sowie steigende Kosten, trotz der aktuell verbesserten Therapiestrategien (Buti et al., 2005). In Deutschland liegt die Prävalenz für das Auftreten von HCV-Antikörpern bei Blutspendern niedriger als in den USA, nämlich unter 0,1 % (Offergeld et al., 2005).

Die Übertragung des Hepatitis C Virus erfolgt überwiegend parenteral, allerdings ist nur für ungefähr 50 % der HCV-Antikörper-positiven Personen anamnestisch einer der bekannten Risikofaktoren zu erfassen. Zu den bekannten Übertragungswegen gehören infizierte Blutprodukte, zum Beispiel Erythrozytenkonzentrate, Immunglobuline und Gerinnungsfaktoren. Seit Einführung des Antikörperscreenings bei Blutspendern ist das relative Risiko einer HCV-Infektion von 0,45 % pro transfundierte Einheit auf 1:100.000 gesunken (Heintges und Wands, 1997). Das Risiko einer perinatalen Übertragung liegt bei 5 bis 6 %, unabhängig von der Art der Geburt (European Paediatric Hepatitis C Virus Network, 2005; Zanetti et al., 1999). Infektionen im Rahmen von Tätowierungen, Piercings oder kulturellen Riten, bei denen es zu einem Blutkontakt kommt, sind möglich. Es kann zu einer Infektionsübertragung durch Nadelstichverletzungen kommen, wobei es bei unter 2 % der Exponierten zu einer Antikörperbildung und / oder Virämie kommt (De Carli et al., 2003; Puro et al., 1995). Vermutlich kann auch eine gemeinsame Benutzung von Rasierklingen und Zahnbürsten zu einer Infektion führen (Gordon et al., 1992). Schließlich wird eine sexuellen Übertragung des Hepatitis C Virus

diskutiert, allerdings in einem weit geringeren Umfang als bei anderen sexuell übertragbaren Virusinfektionen (Alter, 1995; Kao et al., 2000; Vandelli et al., 2004). Zu den Risikogruppen für eine HCV-Infektion gehören Polytransfundierte, Personen mit einem i.v.-Drogenkonsum, Hämophile und Patienten, die einer chronischen Hämodialyse bedürfen (Heintges und Wands, 1997).

1.3 Histopathologie

Die histologische Beurteilung von Leberbiopsien bei chronischer HCV-Infektion dient der Bestätigung der klinischen und serologischen Diagnose, der Einteilung der entzündlichen Aktivität und einer eventuell bestehenden Fibrose sowie der Einschätzung des therapeutischen Erfolgs. Zu den charakteristischen Läsionen bei chronischer Hepatitis C-Infektion gehören portale Lymphoidzellansammlungen, entzündliche Gallengangläsionen und Leberzellverfettung (Bach et al., 1992; Gerber et al., 1992; Lefkowitz et al., 1993). Leberzellnekrosen führen schließlich zu einer Fibrosierung des Lebergewebes (Fischer et al., 1996).

Bei der Beurteilung von Leberbiopsien unterscheidet man ein „grading“ und ein „staging“. Beim sogenannten „grading“ wird die Schwere des nekroinflammatorischen Prozesses definiert, es handelt sich also um ein Maß, das sich im Verlauf einer Infektion in beide Richtungen entwickeln kann. Beim sogenannten „staging“ handelt es sich um eine Beurteilung des Krankheitsfortschritts, eines Prozesses, der im Allgemeinen zunimmt. Die ältere Einteilung in chronisch aktive, persistierende oder lobuläre Hepatitis repräsentiert ein „grading“-System (Desmet et al., 1994).

Die früher übliche morphologische Einteilung der Hepatitis in eine chronisch persistierende und eine chronisch aktive Form erweist sich bei der chronischen HCV-Infektion aus unterschiedlichen Gründen als problematisch. Einerseits findet man eine ausgeprägte lokale Heterogenität bezüglich des entzündlichen Geschehens, so dass in einer Leber unter Umständen unterschiedliche Diagnosen gestellt werden können. Andererseits impliziert eine chronisch persistierende Form, anders als bei der Hepatitis B, hier nicht zwingend einen gutartigen Verlauf, es kann durchaus zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung kommen (Fischer et al., 1996; Zeuzem et al., 1995).

Um die Befundung der Leberbiopsien zu standardisieren etablierten Knodell et al. (1981)

mit dem histologischen Aktivitätsindex ein statistisches Punktesystem zur Beurteilung der entzündlichen Aktivität und Fibrose in einer Leberbiopsie. Beim Knodell-Score repräsentieren die ersten drei Komponenten das Ausmaß der Entzündungsreaktion („grading“), die vierte Komponente die Fibrose („staging“).

Kategorien des histologischen Aktivitätsindex	Punktzahl
I. periportale Entzündung mit oder ohne Brückennekrosen	0 - 10
II. intralobuläre Degeneration und fokale Nekrose	0 - 4
III. portale Entzündung	0 - 4
IV. Fibrose	0 - 4

Tab. 2: Histologischer Aktivitätsindex nach Knodell et al. (1981)

Das Ausmaß der Fibrosierung („staging“) repräsentiert die Stufen einer chronischen Hepatitis, steht in enger Beziehung zu ihrem zeitlichen Verlauf und hat signifikante prognostische und therapeutische Auswirkungen.

Um unterschiedlichem Verlauf, Prognose und Therapie der verschiedenen Formen der chronischen Hepatitiden Rechnung zu tragen, empfehlen Desmet et al. (1994) eine Modifikation des Knodell-Scores, nämlich eine Einteilung der chronischen Hepatitiden bezüglich ihrer Ätiologie, dem Grad der entzündlichen Aktivität („grading“) sowie dem Ausmaß der Fibrose („staging“). Leider bieten der Knodell-Score, ebenso wie die Modifikation nach Desmet, nur eine niedrige Reproduzierbarkeit, da die einzelnen Punkte stark von der subjektiven Einschätzung des Untersuchers abhängen. Daher wurde versucht den Grad der entzündlichen Aktivität zu standardisieren und einen Algorithmus zur semiquantitativen Erfassung der histologischen Aktivität bei chronischer HCV-Infektion zu liefern (Bedossa und Poynard, 1996). Eine Kombination aus diesem histologischen Aktivitätsindex und dem Fibrosegrad bietet das mittlerweile weit verbreitete METAVIR-Punktesystem. Dieses Punktesystem besteht aus zwei Buchstaben-und-Zahlen-Kombinationen, wobei A für die histologische Aktivität und F für den Fibrosegrad steht.

histologische Aktivität	Fibrosegrad
A0 = keine Aktivität	F0 = keine Fibrose
A1 = milde Aktivität	F1 = portale Fibrose ohne Septen
A2 = mittlere Aktivität	F2 = portale Fibrose mit wenigen Septen
A3 = schwere Aktivität	F3 = zahlreiche Septen ohne Zirrhose
	F4 = Zirrhose

Tab. 3: METAVIR-Score zur Beurteilung von Leberbiopsien bei chronischer HCV-Infektion.

1.4 Klinik und Verlauf

Die Inkubationszeit der transfusionsbedingten HCV-Infektion liegt zwischen 5 und 12 Wochen, 70-80 % der Fälle verlaufen inapparent und anikterisch. Selten präsentiert sich die Infektion als akute Hepatitis, deren Form klinisch der der akuten HAV- und HBV-Infektion gleicht. Fulminante Verläufe sind äußerst selten (Sergi et al., 1998; Theilmann et al., 1992). Die klinischen Symptome der chronischen Infektion sind, sofern überhaupt vorhanden, häufig uncharakteristisch und mild und äußern sich z. B. in Müdigkeit, Abgeschlagenheit und anderen konstitutionellen Symptomen oder - selten - Oberbauchbeschwerden (Alter, 1995; Zeuzem et al., 1995). Extrahepatische Manifestationen der HCV-Infektion sind nicht selten, hierzu gehören die gemischt monoklonal / polyklonale Kryoglobulinämie, die membranoproliferative Glomerulonephritis, die Porphyria cutanea tarda, verschiedene kutane Effloreszenzen, wie Lichen Planus und Vitiligo, sowie das Sjögren-Syndrom (Dumoulin et al., 1997c; Eddleston, 1996; El-Serag et al., 2002; Zeuzem et al., 1995).

Genaue Aussagen zur Chronifizierungsrate der HCV-Infektion sind schwierig, da eine akute HCV-Infektion selten diagnostiziert wird und sich die wenigen untersuchten Kollektive bezüglich Alter und Komorbidität stark unterscheiden, so dass die Angaben zwischen 54 und 86 % variieren (Seef, 2002). Es wird geschätzt, dass bei etwa 20 %

der Patienten die chronische Hepatitis C-Infektion innerhalb von 20 Jahren zur Leberzirrhose fortschreitet (Alberti et al., 1999; Freeman et al., 2001). Bei etablierter Leberzirrhose ist dann das Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) deutlich erhöht, welches bei chronischer HCV-Infektion und kompensierter Leberzirrhose bei 28 % in 10 Jahren liegt (Benvegnù et al., 2004). Höheres Alter, ausgeprägte histologische Veränderungen, Alkoholkonsum, männliches Geschlecht, Übergewicht und Leberzellverfettung sowie das Ausmaß der Transaminasenerhöhung im Serum sind Prädiktoren für die Entstehung einer Zirrhose oder einer vermehrten Fibrose (Freeman et al., 2001; Ghany et al., 2003; Hu et al., 2004; Patton et al., 2004; Wright et al., 2003).

Die Überlebensrate sinkt durch bestehende Zirrhose, lange Dauer der Erkrankung, früheren i. v. -Drogenabusus und exzessiven Alkoholkonsum, wohingegen eine Interferon α -Therapie die Überlebensrate bessert (Niederau et al., 1998; Yoshida et al., 2002), möglicherweise auch unabhängig vom Therapieansprechen (Poynard et al., 1999). Allerdings hat Interferon α keinen oder einen nur geringen Einfluss auf die Entstehung eines HCC bei Patienten mit vorbestehender Zirrhose (Bruno et al., 1997; Camma et al., 2001; Fattovich et al., 1997). Zwar findet Nishigushi et al. (1995) einen kurzfristigen positiven Effekt der Interferon α -Behandlung auf die Entstehung eines HCC unabhängig vom Ansprechen, allerdings scheint dieser Effekt bei einem längeren Verlauf der Erkrankung wieder zu verschwinden (Yoshida et al., 2004). Akuta et al. (2007b) beobachten eine verminderte Rate an HCC bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion, die wiederholte Monotherapien erhielten.

1.5 Antivirale Immunantwort

Virale Antigene werden durch bestimmte Strukturmerkmale als körperfremd erkannt, diese Merkmale werden als pathogen-assoziiertes Molekularmuster (pathogen-associated molecular pattern = PAMP) bezeichnet. Immunzellen erkennen diese PAMPs durch verschiedene Membranrezeptoren, die als Muster-erkennende-Rezeptoren (pattern recognition receptors = PRRs) zusammengefasst werden. Eine im Immunsystem weit verbreitete Untergruppe dieser Rezeptoren sind die Toll-artigen Rezeptoren (Toll-like Receptors = TLRs). Durch eine Erregung dieser Rezeptoren kommt es zu einer

Aktivierung latenter zellulärer Transkriptionsfaktoren, die zu einer schnellen Genexpression führen und so die Sofort-Phase der Immunantwort markieren. Wichtige Faktoren, die durch virale PAMPs aktiviert werden, sind der Interferon-Regulationsfaktor 3 (Interferon regulatory factor-3 = IRF-3) und der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B). Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren führt zu einer Ausschüttung von IFN β und weiterer Chemokine und proinflammatorischer Zytokine (Gale und Foy, 2005). Ein Signalweg, der unabhängig von TLR-3 zu einer Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B führt, funktioniert über die Bindung von PAMP über RIG I (Retinoic acid-inducible gene-1), ein RNA-bindendes Protein, welches durch Typ I Interferone induziert wird und durch viele RNA Viren, einschließlich HCV, aktiviert wird (Yoneyama et al., 2004).

Parallel zu dieser angeborenen Immunantwort setzt die erworbene Immunantwort ein. Spezialisierte Zellen, z. B. dendritische Zellen, nehmen die Antigene auf, verarbeiten sie zu immunogenen Peptiden und präsentieren sie dann T-Helfer-Lymphozyten. Menschliche CD4+T-Helfer-Lymphozyten erkennen diese kurzen, antigenen Peptide, die aus den Virusproteinen durch proteolytische Spaltung entstanden und dann mit Hilfe von Histokompatibilitätsantigen (HLA)-Klasse-2-Molekülen an der Oberfläche der antigen-präsentierenden Zellen gebunden werden. Die Aktivierung der CD4+Helfer-Zellen hat überwiegend immunregulatorische Funktionen, sie induziert die Sekretion verschiedener Zytokine, die das Wachstum und die Differenzierung Antigen-spezifischer B-Zellen und zytotoxischer CD8+T-Lymphozyten fördern und Entzündungszellen rekrutieren (Spengler et al., 1996).

T-Helfer-Zellen können in wenigstens 2 Subtypen mit unterschiedlichem Zytokinprofil eingeteilt werden (Mosmann et al., 1986). So produzieren Typ 1-Helfer-Zellen (TH1) unter anderem Interleukin 2, Interferon γ und Lymphotoxin und verstärken damit die zelluläre Immunantwort, während Typ 2-Helfer-Zellen (TH2) Interleukin 4, 5 und 10 sezernieren und so die B-Zellen bei der Antikörperbildung unterstützen. Abgesehen von unspezifischen Effektorzellen stellen Antikörper und zelluläre Zytotoxizität die eigentlichen spezifischen Effektor-Arme des Immunsystems dar, sie neutralisieren Viruspartikel und zerstören virusinfizierte Zellen.

1.5.1 Humorale Immunantwort

Antikörper sind entscheidend für das Neutralisieren freier Viruspartikel und für die Beeinträchtigung des Viruseintritts in die Wirtszelle. Später können Antikörper helfen die Weitergabe des Virus von Zelle zu Zelle einzuschränken, aber das Beseitigen intrazellulärer Viren durch Antikörper und ihr Abtöten durch Komplement-vermittelte Zytotoxizität ist deutlich weniger effizient als Erkennung und Abtöten durch virusspezifische zellvermittelte Reaktionen (Ferrari et al., 1999). HCV-spezifische Antikörper können sowohl gegen Struktur- als auch Nicht-Strukturproteine gerichtet sein. Antikörper gegen Nicht-Struktur-Proteine korrelieren mit viraler Replikation, wohingegen Core-spezifische Antikörper sowohl bei anhaltender als auch bei vergangener Infektion vorgefunden werden können (Yatsushashi et al., 1999).

1.5.2 Zelluläre Immunantwort

CD8+zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind die hauptsächlichen Effektorzellen um virusinfizierte Zellen zu eliminieren. Eine Aktivierung dieser Zellen induziert eine Reihe von zytotoxischen Mechanismen, die schließlich zur Zerstörung der infizierten Zellen führen. Dieser Vorgang kann sowohl für die Beseitigung intrazellulärer Hepatitis C Viren als auch für die Gewebeerstörung durch die Immunantwort relevant sein (Pawlotsky, 1998; Spengler et al., 1996).

1.6 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die in der Effektorphase der natürlichen und der spezifischen Immunantwort produziert werden und der Übermittlung und Regulierung der Immun- und Entzündungsantwort dienen. Die Zytokinsekretion ist kurz und selbstlimitierend, sie wird durch meist vorübergehende Aktivierung der Transkription initiiert, wobei die entstehenden messenger RNA (mRNA) Moleküle kurzlebig und labil sind. Gleiche Zytokine werden oft von unterschiedlichen Zellen gebildet und die einzelnen Zytokine reagieren häufig mit vielen Zelltypen. Wie andere Peptidhormone auch wirken sie durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle. Ein Signalweg, über den die Wirkung der Zytokine übertragen wird, ist der JAK-STAT-Weg.

Die Bindung der Zytokine an ihre Rezeptoren induziert eine Dimerisation, auf die eine Aktivierung der rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase erfolgt (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2). Dieser Rezeptor-Kinase-Komplex interagiert mit einem cytoplasmatischen Transkriptionsfaktor der STAT-Familie. Die phosphorylierten STATs bilden ein Dimer und aktivieren am Zellkern die Transkription verschiedener Zielgene (Gao, 2005).

Interferon (IFN) γ

IFN γ ist ein pleiotropes Zytokin, das überwiegend durch mitogen oder antigen stimulierte T-Lymphozyten produziert wird. Seine biologischen Wirkungen werden durch Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs vermittelt, der hochspezifische Rezeptor kann bei einer Vielzahl von Zellen gefunden werden. Es hat antivirale und antiproliferative Aktivitäten, verstärkt die Zytotoxizität von TNF und induziert die Expression von MHC-Klasse 1-und-2-Molekülen in Zielzellen. Außerdem aktiviert es Makrophagen zur Tumorzerstörung oder Phagozytose von Mikroben und verstärkt die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen (NK).

Zu den weiteren Aktivitäten, die IFN γ zugeschrieben werden, gehört auch die Induktion der T- und B-Zell-Differenzierung, die Verstärkung der Ig-G-Sekretion in ruhenden B-Lymphozyten sowie die Aktivierung von Neutrophilen und Gefäßendothelzellen (Abbas et al., 1991; Gao, 2005). IFN γ spielt also durch seine antivirale, antiproliferative, proapoptische, pro-inflammatorische und immunregulierende Aktivität eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

Tumor Nekrose Faktor (TNF) α

Die Hauptquelle für TNF α sind aktivierte Monozyten und Makrophagen. Es wurden zwei unterschiedliche TNF-Rezeptoren identifiziert, denen man unterschiedliche Aktivitäten zuspricht. Dem einen schreibt man unter anderem Zytotoxizität und antivirale Aktivität zu, während der andere Rezeptor die Aktivitäten der Thymozyten und die CTL-Proliferation zu übermitteln scheint (Tartaglia et al., 1991). Zu den Aktivitäten, die TNF α übermitteln, gehören die Wachstumsstimulation einiger Zellreihen, darunter Fibroblasten und Endothelzellen (Opdenakker et al., 1989), Induktion der Expression verschiedener Antigene wie MHC Klasse 1 und 2, Aktivierung von Leukozyten und antivirale Aktivität. TNF α scheint einer der Hauptmediatoren bei toxischem Schock und Sepsis zu sein und

führt bei chronischer Exposition zur Kachexie. Es stimuliert Monozyten und andere Zellen zur Zytokinproduktion, verstärkt die Synthese verschiedener Serumproteine durch Hepatozyten und nimmt so an der Akutphase-Antwort teil (Abbas et al., 1991).

Weiterhin ist TNF α vermutlich an dem Entzündungs- und Fibrose-Prozess bei chronischer Hepatitis C-Infektion mitbeteiligt, die Serumwerte der TNF α –Rezeptoren steigen proportional mit der Schwere der Leberschädigung im Rahmen der chronischen HCV-Infektion (Itoh et al., 1999).

1.7 Chronische versus selbstlimitierende Hepatitis C-Infektion

Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion zeigen im peripheren Blut hohe Antikörper-Titer, aber eine schwache T-Zell-Antwort. Eine starke T-Zell-Antwort und niedrige oder nicht nachweisbare Antikörper-Spiegel finden sich bei Patienten, die anhaltend das Virus beseitigt haben (Takaki et al., 2000). Es scheint also, dass zur erfolgreichen Eliminierung des Hepatitis C Virus eine effiziente T-Zell-Antwort nötig ist (Cooper et al., 1999; Diepolder et al., 1996; Lechmann et al., 1996; Missale et al., 1996; Sugimoto et al., 2003; Tsai et al., 1997). Sowohl CD4+T-Helfer-Zellen als auch CD8+T-Zellen zeigen bei Menschen mit ausgeheilter HCV-Infektion eine breite viruspezifische Immunantwort, wohingegen bei chronisch Infizierten die T-Zell-Antwort nur gegen wenige Epitope gerichtet ist (Day et al., 2002; Lauer et al., 2004).

Die Rolle der antikörpervermittelten Immunität bleibt unklar. So konnten Pestka et al. (2007) bei einer Untersuchung von Serumproben von Frauen, die im Rahmen einer Anti-D-Prophylaxe mit demselben Hepatitis C Virus infiziert wurden, beobachten, dass die Patientinnen mit einer selbstlimitierenden Form der Erkrankung einen früheren und höheren Anstieg neutralisierender Antikörper boten, wohingegen Patientinnen, die eine chronische Form der Erkrankung entwickelten, keine oder niedrigtitrige neutralisierende Antikörper in einer frühen Phase der Erkrankung boten. Im weiteren Verlauf verlor ein Großteil der Patientinnen mit ausgeheilter HCV-Infektion die neutralisierenden Antikörper wieder, während die Patientinnen mit einer chronischen HCV-Infektion hochtitrige neutralisierende Antikörperspiegel entwickelten. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Patienten mit einer selbstlimitierenden Form der Erkrankung eine breite

neutralisierende Aktivität auch gegenüber heterologen HCV-Partikeln in einer frühen Infektionsphase bieten. Prince et al. (1999) finden Antikörper gegen E2 früher, häufiger und in einem höheren Titer bei Schimpansen und Menschen, die eine chronische HCV-Infektion entwickeln, im Gegensatz zu denjenigen, die eine selbstlimitierende Form der Erkrankung haben. Eine langfristige Persistenz von anti-E2 korreliert mit einer chronischen Infektion. Untersuchungen der E1- und E2-Gensequenzen während der akuten Phase der Hepatitis C-Infektion haben gezeigt, dass bei einer selbstlimitierenden Form der Erkrankung nach der Serokonversion eine geringere Anzahl genetischer Variabilität (Quasispezien) vorliegt als bei einer fortschreitenden Form der Erkrankung (Farci et al., 2000). Eine Chronifizierung scheint also mit einer genetischen Weiterentwicklung des HCV innerhalb der ersten vier Wochen der Infektion zu korrelieren. E2 scheint eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer chronischen HCV-Infektion zu spielen, so zeigt sich bei Lee et al. (2005), dass E2 die Apoptose virusinfizierter Zellen blockiert und so eine erfolgreiche Viruselimination verhindert.

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion liegen sowohl in der Leber als auch im Serum erhöhte TNF α -Werte im Vergleich zu gesunden Probanden vor (Larrea et al., 1996; Zylberberg et al., 1999). Außerdem findet man bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion hohe Werte von IFN γ -mRNA (Abbate et al., 2003). Bei Patienten, die eine selbstlimitierende Form der HCV-Infektion haben, herrschen TH1-Zytokine vor, wohingegen ein Überwiegen der TH2-Antwort mit viraler Persistenz und der Entwicklung einer chronischen Verlaufsform der Erkrankung assoziiert ist (Ferrari et al., 1998; Tsai et al., 1997).

Auffällig ist, dass das HCV bei einem hohen Prozentsatz von Infizierten persistiert, ohne jedoch die Immunabwehr bezüglich anderer Infektionen zu beeinflussen. Die genauen Ursachen für die Viruspersistenz bleiben unklar, es wird jedoch vermutet, dass es verschiedene Schlüssel-Mechanismen bei der Kontrolle und Umgehung der Immunabwehr durch das HCV gibt. So kommt es vermutlich zu einer Verhinderung der IRF-3-Aktivierung und IFN β -Expression durch eine Blockierung des RIG-I (Foy et al., 2005) und des TLR-3-vermittelten Signalwegs (Li et al., 2005) durch NS3/4A. Dies führt zu einer Abschwächung der IFN-Produktion in Hepatozyten. Außerdem sind viele Komponenten der antiviralen Immunität ISG Produkte, so dass es hier zum

Beispiel zu einer ineffektiven Aktivierung der zellulären Immunität kommen könnte mit Problemen bei der Beseitigung virusinfizierter Hepatozyten (Gale und Foy, 2005). Möglicherweise spielen Mechanismen, die später bei der Therapieresistenz bezüglich therapeutisch gegebenem IFN α diskutiert werden, auch eine Rolle bei der akuten HCV-Infektion bezüglich endogenem IFN.

chronische HCV-Infektion	selbstlimitierende HCV-Infektion
hohe AK-Titer im peripheren Blut (in später Infektionsphase)	niedrige oder nicht nachweisbare AK-Titer (in später Infektionsphase)
keine oder niedrigtitrige neutralisierende AK in früher Infektionsphase	früherer und höherer Anstieg neutralisierender AK
schwache T-Zell-Antwort	starke T-Zell-Antwort
T-Zell-Antwort gegen wenige Epitope	breite virusspezifische T-Zell-Antwort
AK gegen E2 früher, häufiger und in einem höheren Titer	
langfristige Persistenz von anti-E2	
vorherrschendes Zytokinprofil TH2	vorherrschendes Zytokinprofil TH1
	geringe Anzahl genetischer Variabilität der E1- und E2-Gensequenz während der akuten Infektion

Tab. 4: Chronische versus selbstlimitierende HCV-Infektion

2 Hepatitis C Virus – spezielle Aspekte

In den folgenden Kapiteln werden spezielle, für diese Arbeit relevante Aspekte der Hepatitis C-Infektion erläutert, es wird auf die Therapie der chronischen HCV-Infektion eingegangen und es werden Prädiktoren für ein Therapieansprechen aufgezeigt. Schließlich werden wirts- und virusspezifische Unterschiede zwischen „Therapieansprechern“ und „Therapieversagern“ beleuchtet.

2.1 Therapie und Prävention

2.1.1 Aktuelle Therapie und Wirkungsweise

Laut aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten sollte bei akuter Hepatitis C Virus-Infektion eine Interferon α -Monotherapie für 24 Wochen durchgeführt werden, das höchste Ansprechen wurde mit einer Dosierung von 5 MIU Interferon α täglich für 4 Wochen, gefolgt von 3x5 MIU Interferon α pro Woche über weitere 20 Wochen beobachtet. Bezüglich des Einsatzes von pegyliertem (PEG) Interferon oder der Durchführung einer Kombinationstherapie fehlen derzeit bei der akuten HCV-Infektion noch ausreichende Daten, ebenso gibt es keinen Konsens bezüglich des Beginns der Therapie. Bei der akuten Infektion sind HCV-Genotypisierung und der quantitative HCV-RNA-Nachweis bisher nicht relevant bezüglich Therapieindikation oder Dosis und Dauer der Interferon-Therapie.

Zur Therapie der chronischen HCV-Infektion sind derzeit zwei Substanzen zugelassen: Interferon α und Ribavirin. Interferone werden sowohl von virusinfizierten Zellen als auch von Lymphozyten produziert, sie binden an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle und aktivieren so eine Signalkaskade, die zu einer Hochregulierung von IFN-stimulierten Genen (ISG's) führt. Dies wiederum führt zur Expression von verschiedenen antiviralen Effektorproteinen. Einer der am besten erforschten Signalwege, über den die Wirkung von Interferon α übertragen wird, ist der JAK/STAT-Weg, wobei IFN α über eine Aktivierung von STAT1 und STAT2 wirkt (Wohnsland et al., 2007). Eines der Schlüsselenzyme, das die antivirale Eigenschaft des

Interferons überträgt, ist die durch doppelsträngige RNA-aktivierte Proteinkinase („double-stranded RNA-activated protein kinase“, PKR). Diese Proteinkinase kann durch Phosphorylierung der alpha-Untereinheit des Proteinsynthese-Initiationsfaktors-2 („eukaryotic initiation factor-2“) die virale Replikation einschränken und reduziert die virale Proteinsynthese.

Andere Effektor-Proteine sind die doppelsträngige RNA-aktivierte 2',5'-Oligoadenylat-synthetase (durch das entstehende Oligoadenylat werden RNasen aktiviert, die relativ zu einem stärkeren Abbau viraler RNA führen), sowie Mx-Proteine, die verschiedene Viren auf der Transkriptionsebene hemmen (Pavlovic et al., 1993; Samuel, 2001; Zeuzem et al., 1995). Zusätzlich ist Interferon an der Stimulation der T-Zell-Proliferation während des Einsetzens der Immunantwort beteiligt (Thomas et al., 1999).

Bis zu 40 % der Patienten mit kompensierter chronischer HCV-Infektion sprechen zumindest vorübergehend auf eine Interferonmonotherapie an. Dabei lässt sich eine biochemische (Normalisierung der Transaminasen) von einer virologischen (negativer HCV-RNA Nachweis) Einteilung des Therapieerfolgs unterscheiden. Nach einer 6-monatigen Interferon-Therapie zeigt sich eine Erfolgsrate von 27-35 % (virologisch) bei Therapieende („end-of-treatment-response“ = ETR). 6 Monate nach Therapieende beobachtet man einen bleibenden virologischen Erfolg nur noch bei 8-30 % der Patienten. Patienten, die auch noch 6 Monate nach Therapieende normale Transaminasen und einen negativen HCV-RNA-Nachweis mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion haben (sogenannte „sustained virological responder“, langfristige Therapieansprecher), bieten eine langfristige und signifikante klinische, virologische und histologische Besserung (Camma et al., 1999; Lindsay, 1997; Reichard et al., 1999).

Studien mit einer antiviralen Kombinationstherapie aus Interferon α und Ribavirin, einem oral verfügbaren synthetischen Guanosin-Analogon mit theoretisch antiviraler und immunmodulatorischer Wirkung, zeigen eine weitere Verbesserung der Rate der langfristigen Therapieansprecher. Die genaue Wirkungsweise des Ribavirins ist nicht bekannt, möglicherweise wirken hier mehrere Mechanismen. So werden eine direkte und indirekte Inhibierung der HCV-Replikation, eine Verstärkung von Mutationen bei der Virusreplikation, eine Immunmodulation zugunsten einer Verstärkung der TH1-Antwort

sowie eine Stabilisierung und Verstärkung des intrazellulären IFN-Signalwegs diskutiert (Feld und Hoofnagel, 2005). Je nach Genotyp, Vorliegen von Zirrhose und Dauer der Kombinationstherapie (24 oder 48 Wochen) beobachtet man signifikant häufigere langfristige virologische Therapieerfolge bei 31-65 % der behandelten Patienten (Barbaro et al., 2000; McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Schalm et al., 1999).

Um gleichmäßigere Wirkspiegel des Interferons zu erzielen und so der Kinetik des Hepatitis C Virus besser zu entsprechen sowie die Nebenwirkungsrate zu minimieren, wurden lang wirksame Interferone, die PEG (pegylierten)-Interferone, durch die Konjugation eines Polyethylen-Glycol Moleküls und Interferon entwickelt.

Fried et al. (2002) konnten eine erhöhte dauerhafte virologische Ansprechrate bei der Behandlung mit PEG-Interferon α -2a plus Ribavirin gegenüber der Standard-Kombinationstherapie beobachten (56 % versus 44 %). Zusätzlich zeigte sich eine bessere Verträglichkeit der Kombinationstherapie mit dem pegylierten Interferon α -2a im Vergleich zu der Standard-Kombination.

Patienten mit Genotyp 1 erreichen höhere Ansprechraten (40-45 %) auf eine 12-monatige Therapie, wohingegen Patienten mit Genotyp 2 und 3 durch eine 6-monatige Therapie ausreichend therapiert werden (Viruselimination bei circa 80 % der Behandelten) (Di Bisceglie und Hoofnagle, 2002). Derzeit sind zwei pegylierte Interferone in Deutschland zugelassen, Peginterferon α -2a (Dosierung 180 μ g einmal pro Woche) und Peginterferon α -2b (Dosierung 0,5-1,0 μ g/kg KG einmal pro Woche in der Monotherapie und 1,5 μ g/kg KG einmal pro Woche in der Kombinationstherapie). Nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten erfolgt die Standardtherapie der chronischen HCV-Infektion mit einem pegylierten Interferon α in Kombination mit Ribavirin. Die Therapiedauer richtet sich nach dem HCV-Genotyp, so sollten Patienten mit einer Infektion mit dem Genotyp 1 über 12 Monate, Patienten, die mit Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, über 6 Monate therapiert werden.

Genotyp	Therapiedauer	Tägliche Ribavirindosis
1	12 Monate	1000-1200 mg
2+3	6 Monate	800 mg

Tab. 5: Therapieempfehlung für PEG-Interferon/Ribavirin-Kombinationstherapie laut Leitlinien

Bei Patienten mit Genotyp 2 und 3 scheint die Gabe von 800 mg Ribavirin täglich optimal, wohingegen bei Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind, eine Gabe von täglich 1000 bis 1200 mg (gewichtsadaptiert) notwendig erscheint. Bei Kontraindikationen für eine Ribavirintherapie sollte eine Monotherapie mit einem PEG-Interferon erfolgen (Zeuzem, 2004).

Zum Zeitpunkt, an dem unsere Studie durchgeführt wurde, gab es noch keine PEG-Interferone, Ribavirin wurde zu diesem Zeitpunkt nur im Rahmen von Studien verabreicht, einheitliche Therapieempfehlungen, wie sie jetzt vorliegen, gab es zu diesem Zeitpunkt noch nicht, so dass die in unserer Studie verwandten Therapien nicht den oben genannten aktuellen Therapiestandards entsprechen.

Zu den absoluten Kontraindikationen für die Interferon α -Therapie gehören Schwangerschaft und Stillzeit, symptomatische koronare Herzerkrankung, symptomatische Herzinsuffizienz, Leberzirrhose (Child Stadium C), Diabetes mellitus mit ausgeprägten Sekundärkomplikationen, schwere Neutro- oder Thrombopenie, manifeste Psychose oder aktueller Drogen- oder Alkoholmissbrauch (Zeuzem, 2004).

Unerwünschte Nebenwirkungen sind im Rahmen einer Interferon-Therapie nicht selten, sie kann typischerweise zu grippeähnlichen Symptomen wie Kopf- und Gliederschmerzen sowie erhöhten Temperaturen führen, weiterhin kann Interferon α unter anderem Granulozyto- und Thrombozytopenien, Haarausfall, gastrointestinale Symptome, Depressionen, Konzentrationsstörungen, Seh- und Hörstörungen sowie die Exazerbation oder Neuinduktion einer Autoimmunerkrankung auslösen (Dumoulin et al., 1999; Zeuzem et al., 1995).

2.1.2 Mögliche Ursachen einer Therapieresistenz

Die Hemmung IFN-induzierter antiviraler Aktivitäten durch das Virus dürfte eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Virusinfektion spielen. Da für eine effektive und

erfolgreiche IFN α -Therapie das Funktionieren des Signalwegs für die Produktion antiviraler Proteine notwendig ist, kann jeder Faktor, der das Funktionieren einzelner Komponenten der JAK-STAT-Signalkaskade beeinflusst, die Effizienz der IFN α -Behandlung negativ beeinflussen. Möglicherweise spielen hier auch wirtsspezifische Besonderheiten eine Rolle. So konnten He et al. (2006) zeigen, dass es systematische Unterschiede in der Höhe der Transkriptionsantwort zwischen NR und SVR gibt sowie zwischen weißen und Afro-Amerikanern.

Es hat sich gezeigt, dass die Expression von HCV-Proteinen über eine Verminderung der Methylierung von STAT 1 die durch IFN α induzierte Signalübertragung über den JAK-STAT-Weg hemmt (Duong et al., 2004), außerdem kommt es durch die Expression der HCV-Proteine zu einer Störung der Effektorfunktionen des IFN (De Lucas et al., 2005; Heim et al., 1999). Es gibt Proteine, die die Zytokinantwort regulieren, hierbei ist die Familie der SOCS (suppressor of cytokine signaling = Unterdrücker der Zytokinsignale) die wichtigste. Als Antwort auf eine Zytokin-Stimulation werden SOCS-Proteine induziert und regulieren die Zytokinsignale, die ihre eigene Bildung induziert haben, im Sinne eines klassischen negativen Feedback-Bogens herunter. Viele Zytokine, unter anderem IFN α , IFN γ und TNF α sind dafür bekannt die SOCS-Expression in Hepatozyten zu induzieren (Gao et al., 2004; Hong et al., 2001). Weitere Proteinfamilien, die den JAK-STAT-Signalweg hemmen, sind PIASs (protein inhibitors of activated STATs = Protein-Inhibitoren der aktivierten STATs) und PTPs (Protein Tyrosin Phosphatasen). Hong et al. (2001) fanden heraus, dass TNF α die SHP2 (SH2 containing protein-tyrosine phosphatase 2 = SH2 enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase 2)- Proteinexpression in Leberzellen induziert und vermutlich so an einer Therapieresistenz gegenüber IFN α beteiligt ist.

E2 hat durch die Hemmung der Interferon-induzierten Protein-Kinase (PKR) Einfluss auf die Interferon-Resistenz verschiedener Virusstämme. Möglicherweise ist IFN zum Teil deswegen ineffektiv in der Behandlung der chronischen Hepatitis C Virus-Infektion, weil das Virus effektiv die PKR-Funktion unterdrücken kann (Taylor et al., 1999; Taylor et al., 2001).

Vermutlich gibt es verschiedene Mechanismen, durch die das NS5A-Protein zu einer Therapieresistenz gegenüber Interferon führen kann, so zum Beispiel über die Induktion

von Chemokinen (Polyak et al., 2001). Mutationen in der Interferon α -Sensibilitatbestimmenden Region (ISDR) innerhalb des NS5A-Proteins sind an der IFN α -Sensibilität bei Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 1b infiziert sind, beteiligt. Eine hohe Mutationsrate ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Therapieansprechens korreliert (Wohnsland et al., 2007).

Die Expression hepatischer IFN α/β -Rezeptoren ist bei langfristigen Therapieansprechern signifikant höher als bei Therapieversagern (Mathai et al., 1999; Morita et al., 1999; Yatsunami et al., 1999), eine Resistenz gegenüber einer Interferon-Therapie könnte also auch durch niedrige hepatische Interferon-Rezeptoren bedingt sein.

Das zusätzliche Vorhandensein einer extrahepatischen Manifestation des HCV könnte mit einer IFN-Resistenz oder zumindest einem langsameren Ansprechen auf Interferon eine weitere Ursache für eine Therapieresistenz sein (Thomas et al., 1999).

Ein fehlendes Ansprechen auf eine erste Interferon-Therapie könnte durch Selektion IFN-resistenter Viren unter dem Selektionsdruck endogenen Interferons bedingt sein, die noch niedrigere Ansprechrate auf einen weiteren Therapieversuch mit einer Monotherapie (Davis et al., 1998) ist möglicherweise durch die Selektion weiterer IFN-resistenter Stämme erklärbar (Thomas et al., 1999).

2.1.3 Neuere Ansätze und Ausblick

Möglicherweise wird die Therapie der chronischen HCV-Infektion, ähnlich wie bei der HIV-Infektion, langfristig aus einer Kombinationstherapie aus unterschiedlichen antiviralen Wirkstoffen bestehen, die an unterschiedlichen viralen, möglicherweise auch wirtseigenen Zielen ansetzen.

Weitere therapeutische Optionen werden durch die Entwicklung von direkten antiviralen Medikamenten wie Inhibitoren der Protease/Helikase sowie der RNA-abhängigen Polymerase des HCV erwartet (Wohnsland et al., 2007). Zu verschiedenen HCV-Proteasehemmern laufen derzeit Phase II-Studien sowohl in Kombination mit PEG-IFN und Ribavirin als auch in Kombination mit PEG-IFN allein. Es finden auch verschiedene weitere Untersuchungen mit molekularbiologischen Ansätzen statt, so zum Beispiel mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die ribosomale Bindungsstelle der 5'UTR-Region des

HCV-Genoms, mit Ribozymen, die sequenz-spezifische RNA-Spaltungen katalysieren (Carreno und Quiroga, 1996; Zein und Zein, 2002) und auch mit siRNA (short interfering RNA) bzw. shRNA (vector-encoded short hairpin RNA), die zu einer Induktion von „RNA interference“ führen, einem natürlichen Prozess um fremde RNA zu erkennen und zu zerstören (De Francesco und Migliaccio, 2005). Weitere Therapiemöglichkeiten auf der Zytokin- und T-Zell-Ebene werden derzeit untersucht, so z. B. synthetische Agonisten der Toll-artigen Rezeptoren (TLR's), die Mikroorganismen erkennen und zu einer schnellen Aktivierung der Entzündungsreaktion und mikrobizider Pfade führen (De Francesco und Migliaccio, 2005); auch hierzu laufen derzeit bereits erste Phase I- und II-Studien zum Teil als Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin. Es gab vielversprechende Ergebnisse bezüglich einer antiviralen Triple-Therapie aus Interferon, Ribavirin und Amantadine (einem antiviralen Medikament, das zur Therapie der Influenza A Virus-Infektion eingesetzt wird) in der Behandlung von Patienten, die auf eine vorhergegangene Interferon-Therapie kein Ansprechen zeigten (Brillanti et al., 2000; Deltenre et al., 2004). Es gibt hierzu jedoch auch widersprüchliche Studien (Hasan et al., 2004; Lim et al., 2005), so dass weitere Forschungen in dieser Richtung abzuwarten sind.

2.1.4 Vakzine

Die Entwicklung eines funktionsfähigen Impfstoffes ist trotz intensiver Bemühungen derzeit noch nicht zu erwarten. Dies liegt unter anderem an der hohen Mutagenität des Hüllproteins, was eine längerfristige Antikörper-vermittelte Immunität verhindert. Aufgrund der bisher enttäuschenden Versuche eine stabile Antikörper-vermittelte Immunität zu erzielen, gibt es verstärkte Anstrengungen, Impfstrategien zu entwickeln, die eine starke T-Zellantwort induzieren. Es gibt bereits einige vielversprechende Untersuchungen am Maus-Modell mit unterschiedlichen Antigenen, hier bleiben jedoch weitere Untersuchungen und die ersten geplanten klinischen Studien abzuwarten (El-Gogo et al., 2008; Encke et al., 2007; Fournillier et al., 2007; Zabaleta et al., 2008). Elmowalid et al. (2007) konnten durch eine Immunisierung mit Virus-ähnlichen Partikeln (HCV-LP's) bei Schimpansen eine protektive zelluläre Immunität erzielen.

Für einen therapeutischen T-Zellimpfstoff für Patienten, die auf eine vorausgegangene Kombinationstherapie mit Interferon α und Ribavirin nicht angesprochen haben, laufen

derzeit Phase II-Studien (Firbas et al., 2006).

2.1.5 Orthotope Lebertransplantation

Kommt es bei einem Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion zu lebensbedrohlichen Komplikationen einer Zirrhose, bleibt als ultima ratio nur noch die Möglichkeit einer Lebertransplantation. Zwar kommt es in dem transplantierten Organ regelmäßig zu einer Neuinfektion, allerdings verläuft diese meist mild. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit in Europa bei ca. 75 % (Feray et al., 1999; Velidedeoglu et al., 2004).

2.2 Prädiktoren eines Therapieerfolges

Um die Ursachen einer Therapieresistenz besser zu verstehen und dieses Problem durch alternative oder auch modifizierte Therapieverfahren zu lösen, wurden bereits früh virus- und wirtsspezifische Eigenschaften bezüglich ihres Einflusses auf ein Therapieansprechen untersucht.

Bei den zum Zeitpunkt unserer Untersuchung vorliegenden Arbeiten (Tab. 6) wurden die Aussagen bezüglich einer IFN α -Monotherapie getroffen, da zu diesem Zeitpunkt noch nicht die derzeit aktuellen Therapieverfahren angewandt wurden. Die später durchgeführten Arbeiten (Tab.7) beziehen sich überwiegend auf Kombinationstherapien mit IFN α und Ribavirin, wobei hier das verwandte Interferon differiert. Interessanterweise treffen viele Aussagen, die bezüglich der IFN α -Monotherapie getroffen wurden, auch auf die Kombinationstherapie zu.

Zu den Faktoren, die in univariater Analyse bei vielen Autoren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einem langfristigen Therapieerfolg assoziiert sind, gehören junges Alter, kurze Krankheitsdauer, fehlende Zirrhose, viraler Genotyp 2 und 3, ein aggressiveres Therapieschema und niedrige HCV-RNA-Werte vor Therapiebeginn (Conjeevaram et al., 1995; Martinot-Peignoux et al., 1998; Tong et al., 1997). Werden diese Faktoren allerdings multivariat analysiert, zeigt sich, dass überwiegend virologische Faktoren, nämlich ein niedriger Serum-HCV-RNA-Spiegel (Manesis et al., 1997; Martinot-Peignot et al., 1998; Yatsunami et al., 1999) sowie die Genotypen 2 und 3 (Berg et al., 2003; Chemello et al., 1995; Yu et al., 2007) mit einem langfristigen Therapieerfolg assoziiert sind. Nach Shiratori et al. (1997) ist die Viruslast bei Patienten,

die mit dem Serotyp 2 infiziert sind, signifikant niedriger als bei solchen, die mit Serotyp 1 infiziert sind, und somit ist das HCV-RNA-Replikationsniveau der wichtigste Faktor für den Erfolg einer IFN α -Therapie.

Verschiedene Autoren assoziieren auch klinische und wirtseigene Faktoren in multivariater Analyse mit einer höheren Ansprechrate. Bei Chemello et al. (1995) sind dies eine kürzere Krankheitsdauer, jüngeres Alter (auch Tomimatsu et al., 2006) und ein aggressiveres Therapieschema (auch Akuta et al., 2007a), bei Pagliaro et al. (1999) eine fehlende Zirrhose (auch Walsh et al., 2006) und eine kurze Krankheitsdauer. Nach Yatsunami et al. (1999) sind außerdem eine höhere Anzahl an Interferon-Rezeptoren mit einem häufigeren Ansprechen verbunden.

Schon früh zeigte sich, dass die virale Kinetik unter der Therapie Aussagen zum Erreichen eines langfristigen Therapieansprechens zulässt (Zeuzem et al., 1998). Diese bezüglich einer Monotherapie getroffene Aussage bestätigt sich auch bei verschiedenen aktuelleren Untersuchungen (Berg et al., 2003; Ferenci et al., 2005; Yu et al., 2007).

Trotz in einigen Fällen doch übereinstimmender Ergebnisse gibt es also weiterhin wenige verbindliche Prädiktoren für einen Therapieerfolg. Wegen des insgesamt geringen prädiktiven Werts sollten diese Merkmale nicht dazu benutzt werden, Patienten von einer potentiell wirksamen Therapie auszuschließen. Möglicherweise kann eine Beobachtung der Viruskinetik, vor allem auch bei erheblichen Nebenwirkungen, dazu herangezogen werden, um eine Therapie bei Patienten, die persistierend hohe Viruslasten zeigen, vorzeitig abubrechen. Eine gewisse Aussage bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer Viruselimination ist möglich, weiterhin können aufgrund der Ergebnisse weitere Vermutungen über die Ursachen einer Viruspersistenz angestellt werden, möglicherweise können modifizierbare Risikofaktoren identifiziert und behandelt werden.

Weitere Faktoren wurden mit dem Ansprechen auf eine IFN α -Therapie assoziiert. So beobachten Depraetere et al. (2000) höhere prätherapeutische E1- und E2-Antikörper bei Patienten, die das Virus anhaltend eliminiert haben („sustained virological responder“, SVR) im Gegensatz zu Patienten, bei denen es zu einem Wiederauftreten der Virämie nach Therapieabschluss kam („relapse“, RP), und Patienten, die kein Ansprechen auf die Therapie zeigten („non-responder“, NR). Bei SVR zeigte sich außerdem eine signifikante Reduktion der E1-Antikörpertiter während und nach der Therapie.

Autor	Untersuchte Patienten	Prädiktoren für langfristiges Therapieansprechen
Yatsuhshi et al. 1999	55	univariat: Serotyp 2, Grad der entzündlichen Aktivität in der Leber, höhere hepatische IFN-alfa/beta-Rezeptor-Werte, niedrige HCV-RNA-Werte prätherapeutisch multivariat: höhere IFN-Rezeptor-Werte, niedrige HC-Viruslast
Zeuzem et al. 1998	70	univariat: Rückgang der HCV-RNA-Werte um mehr als 3 Logarithmen innerhalb der ersten 4 Therapiewochen, anderer HCV-Genotyp als 1
Martinot-Peignoux et al. 1998	296	univariat: Alter < 40 Jahre, Infektionsmodus i.v.-Drogenabusus oder unbekannt, höhere IFN-Dosis (kumulative Dosis > 360 Mill. IU) besonders bei Genotyp 2 u. 3, normale Serum-ALT-Werte nach 1 Monat Therapie, HCV-Genotyp 2a oder 3a, niedrige HCV-RNA-Werte prätherapeutisch multivariat: niedrige Serum-HCV-Werte, HCV-Genotyp anders als 1a oder 1b, Übertragungsmodus nicht über Blutprodukte, höhere IFN-Dosis
Manesis et al. 1997	211	multivariat: niedrige HCV-RNA-Werte vor Therapie, negativer HCV-RNA-Nachweis bei Therapieende
Tong et al. 1997	103	univariat: HCV-Genotyp anders als 1, niedrige HCV-RNA-Werte vor Therapie, niedriger bzw. kein HCV-RNA-Nachweis nach 12 Wochen Therapie, Normalisierung der ALT-Werte nach 12 Wochen Therapie
Shiratori et al. 1997	300	univariat: Serotyp 2, niedrige HCV-RNA-Werte vor Therapie bivariat: niedrige Viruslast prätherapeutisch
Larrea et al. 1996	36	niedrige TNF α -Werte in PBMC vor Therapiebeginn
Chemello et al. 1995	321	univariat: Alter < 45, bekannte Krankheitsdauer < 60 Monate, normale γ -GT, Infektion mit Genotyp 2 u. 3 multivariat: Genotyp 2 u. 3, kürzere Krankheitsdauer, jüngerer Alter, aggressiveres Therapieschema (540-860 IU IFN in 12 Monaten)
Martinot-Peignoux et al. 1995	141	univariat: junges Alter, Infektionsmodus i.v.-Drogenabusus oder unbekannt, kürzere Krankheitsdauer, niedrige prätherapeutische HCV-RNA-Werte, Genotyp 3a multivariat: niedrige prätherapeutische Viruslast, Genotyp anders als 1b
Pagliario et al. 1994	361	multivariat: keine histologischen Anzeichen für Zirrhose, kurze Krankheitsdauer

Tab. 6: Prädiktoren eines langfristigen Therapieerfolgs

Autor	Untersuchte Patienten	Prädiktoren für langfristiges Therapieansprechen
Berg et al. 2003	260 Genotyp1-4	multivariat: (pos. Prädiktoren) Genotyp 2+3, niedrige γ -GT-Werte, hohe initiale GPT-Werte, niedrige Viruslast prätherapeutisch; (neg. Prädiktoren) Viruslast > 450.000 IU/ml 4 Wochen nach Therapiebeginn und > 30.000 IU/ml 12 Wochen nach Therapiebeginn
Ferenci et al. 2005	1121	frühe Suppression der HCV-Replikation
Males et al. 2007	100 95 % Genotyp 4	multivariat: (neg. Prädiktoren) HCV-RNA-Viruslast, Serum-AFP-Werte oberhalb des Mittelwerts
Backus et al. 2007	5.944 Genotyp 1-3	multivariat: Genotyp 1: (neg. Prädiktoren) Afro-Amerikaner, klinische Lebererkrankung, Diabetes, niedriges Cholesterol, niedriger Hb, niedrige Thrombozytenzahl, Behandlung außerhalb eines Zentrums; (pos. Prädiktoren) niedrige Viruslast, erhöhter ALT-Quotient, Behandlung mit PEG IFN2A Genotyp 2: (neg. Prädiktoren) hoher BMI, vorherige IFN-Therapie, niedrige Thrombozytenzahl; (pos. Prädiktoren) niedrige Viruslast Genotyp 3: (pos. Prädiktoren) PEG IFN2A
Yu et al. 2007	105 Genotyp1-3	univariat: Viruslast, Genotyp, schnelles virologisches Therapieansprechen, frühes virologisches Therapieansprechen multivariat: Genotyp, schnelles virologisches Therapieansprechen, frühes virologisches Therapieansprechen
Akuta et al. 2007	114 Genotyp 1b	multivariat: (pos. Prädiktoren) hohes LDL-Cholesterin, Aminosäure-Austausch in der Cor-Region, niedriger γ -GT-Wert, hohe Ribavirindosis, normale Leberfunktion (ICG R15 < 10%), männl. Geschlecht
Tomimatsu et al. 2006	105 Genotyp1+2	multivariat: Genotyp 2, jüngeres Alter (< 53 Jahre), erhöhte TH2-Zytokine
Walsh et al. 2006	145 Genotyp 1-4	multivariat: (neg. Prädiktoren) Genotyp 1 oder 4, Zirrhose in der prätherapeutischen Leberbiopsie, BMI \geq 30 kg/m ²

Tab. 7: Neuere Prädiktoren eines langfristigen Therapieerfolgs

Sobue et al. (2001) finden eine Korrelation zwischen einer dominanten TH1-Antwort im peripheren Blut und in der Leber sowie der Krankheitsaktivität und dem Krankheitsfortschritt bei chronischer HCV-Infektion. Die Höhe der Typ 1-Zytokine IL-2, IFN γ und TNF β sowie IL-8 zeigen eine signifikante Korrelation mit der Hepatitis-Aktivität. Es stellt sich

heraus, dass TH1-Zytokine bei Therapieversagern und TH2-Zytokine bei Therapieansprechern dominieren. Ein virologisches Ansprechen auf die IFN-Therapie ist nach Cramp et al. (2000) mit einer Aktivierung der HCV-spezifischen T-Zell-Reaktion in einer frühen Therapiephase gekoppelt. SVR zeigen eine stärkere und längerandauernde Verstärkung der T-Zell-Antwort gemeinsam mit einer stärkeren IFN γ -Produktion, wohingegen NR nur eine schwache oder gar keine Lymphoproliferation zeigen und eher IL-10 als IFN γ produzieren. Durch zusätzliche Gabe von Ribavirin ergibt sich kein Unterschied in der T-Zell-Proliferation, aber das Zytokinegleichgewicht wird zugunsten einer TH1-Antwort mit Unterdrückung der IL-10-Produktion moduliert. Auch bei Nelson et al. (1998) hat die T-Zell-Antwort wichtigen Einfluss auf das Ansprechen auf eine Interferon-Therapie. Patienten mit einer prätherapeutisch nachweisbaren intrahepatischen Aktivität Hepatitis C-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) sprechen signifikant häufiger auf eine IFN α -Therapie an als solche, bei denen keine CTL-Aktivität nachweisbar ist.

Sarrazin et al. (2005) fanden Hinweise dafür, dass eine gut funktionierende zelluläre Immunfunktion Einfluss auf den Ausgang einer IFN α -Kombinationstherapie hat. Patienten mit einem bestimmten Genpolymorphismus (GNB3 825CC), welcher mit einer verminderten Immunzellfunktion assoziiert ist, sprechen signifikant seltener auf eine Kombinationstherapie an. Außerdem zeigt sich, dass Afro-Amerikaner signifikant schlechter auf eine IFN-Therapie ansprechen als weiße Amerikaner (Backus et al., 2007). Als mögliche Ursache hierfür und Hinweis auf eine möglicherweise angeborene verminderte Immunfunktion konnte eine verminderte Transkriptionsantwort bei Afro-Amerikanern auf die Gabe von IFN in Zellkulturen beobachtet werden (He et al., 2006). Diese verminderte Transkriptionsantwort auf die Gabe von IFN wurde auch in Zellkulturen von Patienten gefunden, die nicht auf eine IFN-Therapie ansprechen (He et al., 2006).

Die intrahepatische Zytokinexpression scheint einen wichtigen Einfluss sowohl auf den natürlichen Verlauf der Hepatitis C-Infektion als auch auf den Erfolg einer antiviralen Therapie zu haben. Guidotti et al. (1999) konnten im Tiermodell beobachten, dass IFN γ und TNF α notwendig für die Viruselimination in Hepatozyten sind. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich bei der chronischen HCV-Infektion, im Gegensatz zur chronischen HBV-Infektion, hohe intrahepatische Werte für IFN γ finden

(Dumoulin et al., 1997b), auch Abbate et al. (2003) fanden erhöhte intrahepatische mRNA-Werte für IFN γ bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion im Vergleich zu nicht-alkoholischer Steatohepatitis. Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion finden sich in der Leber und im Serum erhöhte TNF α -Werte im Vergleich zu gesunden Probanden (Larrea et al., 1996; Zylberberg et al., 1999), außerdem induzieren diese beiden Zytokine die SOCS-Expression in Hepatozyten und haben damit möglicherweise einen Einfluss auf die Therapieresistenz (Gao et al., 2004). Es zeigt sich bei Larrea et al. (1996) im Gegensatz zu Zylberberg et al. (1999) ein signifikanter Unterschied der hepatischen prätherapeutischen TNF α -Werte zwischen SVR und NR. Bei SVR sind die entsprechenden Werte deutlich niedriger als bei Patienten, die nur einen kurzfristigen Therapieerfolg zeigen oder gar nicht auf die Therapie ansprechen (NR). Außerdem finden Larrea et al. (1996) hohe TNF α -Werte bei Patienten, die mit dem Genotyp 1b infiziert sind, der mit einem deutlich schlechteren Ansprechen auf die Interferon-Therapie assoziiert ist. Im Gegensatz dazu finden Fukuda et al. (1996) keinen Unterschied zwischen den prätherapeutischen TNF α -Werten bei Patienten, die auf eine IFN α -Therapie ansprechen und solchen, die nicht ansprechen, wohl aber prätherapeutisch signifikant erhöhte Werte bei IL-2, TNF β und IFN γ bei NR (biochemische Definition des Ansprechens). Weder die Ursachen dafür, dass HCV in einem Großteil der Fälle zu einer chronischen Infektion führt, noch die Gründe für eine Resistenz sowohl gegen die Mono- als auch gegen die Kombinationstherapie sind geklärt. Mögliche Ursachen für eine Therapieresistenz wurden untersucht, virusspezifische Faktoren wie die NS5A Region oder die Entstehung von Ausweichmutationen durch Selektionsdruck, aber auch wirtsspezifische Faktoren wie die Expression hepatischer IFN-Rezeptoren oder bestimmte „Immundefekte“ könnten eine Rolle bei der Interferonresistenz spielen. Bestimmte Zytokinprofile (TH1) dominieren bei NR sowie bei einer selbstlimitierenden Form der Erkrankung. Um einen möglichen Einfluss der Zytokinexpression auf das Therapieansprechen genauer zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit daher die prätherapeutischen intrahepatischen Zytokinprofile der beiden Typ 1-Zytokine IFN γ und TNF α semiquantitativ bestimmt und mit dem Ansprechen der nachfolgenden antiviralen Therapie korreliert.

Therapieansprecher (responder)	Therapieversager (non-responder)
höhere prätherapeutische E1-und E2-AK	
Reduktion der E1-und E2-AK während und nach der Therapie	
prätherapeutische intrahepatische TNF α -Werte niedriger	
TH2-Zytokine dominierend	TH1-Zytokine dominierend
stärkere und länger andauernde Verstärkung der T-Zellantwort	schwache oder keine Lymphoproliferation
stärkere IFN γ -Produktion unter Therapie	eher IL-10-Produktion
nachweisbare intrahepatische Hepatitis C-spezifische CTL-Aktivität	
	verminderte zelluläre Immunfunktion durch Genpolymorphismus
	verminderte Transkriptionsantwort auf die Gabe von IFN

Tab. 8: Therapieansprecher versus Therapieversager

3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation möglicher Prädiktoren für den Therapieverlauf einer IFN α -Therapie bei chronischer HCV-Infektion. Daher wurden einerseits bereits bekannte virus- und wirtsspezifischen Faktoren bezüglich ihres Einfluss auf das Therapieansprechen untersucht, andererseits wurde die mRNA der beiden TH1-Zytokine IFN γ und TNF α intrahepatisch nachgewiesen und die semiquantitativ ermittelte Höhe der Zytokine mit dem nachfolgenden Therapieverlauf korreliert.

II. Material und Methoden

In unserer Untersuchung wurde die intrahepatische Zytokin-mRNA bei 35 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion untersucht, bei denen in dem Zeitraum von April 1994 bis November 1996 vor einer geplanten Interferon-Therapie eine routinemäßige Leberbiopsie durchgeführt wurde. Hierbei wurde der größere Anteil der Biopsie der histologischen Routinediagnostik zugeführt, ein kleinerer Teil wurde aufgearbeitet und für die semiquantitative mRNA-Bestimmung verwendet. Vor Durchführung der Untersuchung wurde die Zustimmung der Bonner Ethikkommission eingeholt, hierbei wurden die Richtlinien der Erklärung von Helsinki von 1975 (World Medical Association) eingehalten.

1 Patientencharakteristika

Von den 35 untersuchten Patienten waren 11 Frauen und 24 Männer, das mittlere Alter betrug zum Zeitpunkt der Biopsie 42,1 Jahre (13 bis 68 Jahre). Bezüglich der möglichen Risikofaktoren zeigte sich folgende Konstellation: 11 Patienten litten an einer Hämophilie A oder B, bei sieben Patienten war in der Vorgeschichte eine Operation oder Transfusion bekannt, drei Patienten waren im Vorfeld i.v. drogenabhängig (ivDa), bei vier Patienten bestand der Verdacht der Übertragung im Rahmen einer Nadelstichverletzung und bei den restlichen 10 Patienten konnte kein Übertragungsmodus eruiert werden.

Bei allen Patienten war eine chronische Hepatitis C Virus-Infektion durch Antikörpernachweis durch einen Matrix-ELISA der dritten Generation (Fa. Abbot, Wiesbaden, Deutschland) und mehrfachen positiven HCV-RNA-Nachweis mittels reverser Transkription und nachfolgender Polymerasekettenreaktion (Fa. Roche Diagnostics, Lörrach, Deutschland) gesichert.

Name	Alter	Geschlecht	Risikofaktor	Viruslast	Genotyp
J.A.	30	m	unbekannt	555.295	1
F.B.	60	w	unbekannt	550.000	1b
E.B.	35	m	Transfusion		2b
S.D.	13	m	HA		
M.I.	38	m	unbekannt	21.750	3
Z.J.	14	m	HA		
E.M.	58	w	Nadelstichverletzung	39.491	2
J.M.	47	m	unbekannt	799.465	1
A.O.	45	m	Nadelstichverletzung	873.155	unspezifisch
D.S.	38	m	HA	250.793	2b
U.S.	66	m	unbekannt	2.177.419	1
R.B.	25	m	HA	529.411	2+3
K.F.	38	w	Transfusion	6.474.056	1
R.H.	43	m	Nadelstichverletzung	634.615	1
T.K.	31	m	ivDa		
C.M.	37	w	Operation	4.698.291	
R.M.	55	w	Transfusion	2.726.161	1b
B.N.	42	m	Nadelstichverletzung	34.288	4c/d
W.O.	68	m	unbekannt	1.670.740	unspezifisch
E.R.	60	w	unbekannt	408.497	1a
R.S.	32	m	HA	851.000	1b
M.S.	30	m	HA	891.156	unspezifisch
H.S.	55	m	HB	3.489.305	1a
A.T.	56	w	Transfusion	4.007.101	1
R.G.	62	m	unbekannt	647.222	1
R.K.	34	w	Transfusion	2.076.489	1b/2a/c
I.M.	51	w	unbekannt	481.000	1a
G.P.	38	m	unbekannt		3a
W.R.	54	m	HA		
H.R.	22	m	HA	3.995.556	1a
P.S.	40	w	ivDA		3a
P.Sch.	26	m	HA		
J.T.	23	m	HA	567.000	2
P.W.	44	m	ivDA		2b
E.W	63	w	Transfusion	2.934.131	1

Tab. 9: Patientencharakteristika, Viruslast und HCV-Genotyp

2 Diagnostik

2.1 Bestimmung der Viruslast

Die Viruslast wurde bei 26 Patienten prätherapeutisch quantifiziert. Die Quantifizierung der Viruslast erfolgte mit einem kommerziellen quantitativen RT-PCR-Assay („Amplicor HCV Monitor assay“, Fa. Roche Diagnostics, Lörrach, Deutschland). Bei diesem Testsystem wird ein interner Quantifizierungsstandard verwendet, der dazu dient, die Effizienz der RNA-Extraktion, -Amplifikation und -Detektion abzuschätzen, und außerdem als Bezugsgröße für die Bestimmung der Anzahl der HCV-Kopien dient. Dieses Testsystem erlaubte damals eine genaue Quantifizierung in einem Bereich zwischen 1.000 und 1.000.000 Kopien pro Milliliter (Colucci und Gutekunst, 1997). Die damals übliche Einheit zur Bestimmung der Viruslast, Kopien pro Milliliter, ist heute nicht mehr aktuell; um unterschiedliche Testsysteme vergleichbar zu machen, verwendet man heute die Einteilung in IU/ml (Internationale Einheiten pro Milliliter); der Umrechnungsfaktor für das von uns verwandte Testsystem beträgt: 1 IU/ml entsprechen 0,9 Kopien/ml.

2.2 HCV-Typisierung

Bei 11 Patienten wurde die Genotypisierung mit dem Peptid ELISA nach Simmonds et al. (1993) durchgeführt. Eine HCV-Subtypisierung erfolgte bei 14 Patienten mit einem kommerziell verfügbaren Kit („Inno-Lipa HCV II line probe assay“, Fa. Inogenetics, Zwijndrecht, Belgien). Diese Untersuchung, die auf dem Vorhandensein von Variationen in der 5'UTR Region verschiedener HCV-Genotypen beruht, basiert auf dem Prinzip der reversen Hybridisation. Bei sechs Patienten konnte die Virustypisierung nicht durchgeführt werden und drei Patienten waren mit den verwandten Testsystemen nicht typisierbar. Bei den typisierten Patienten zeigte sich folgende Verteilung: 15 Patienten waren mit dem Genotyp 1 infiziert (53 %). Bei fünf Patienten zeigte sich eine Infektion mit dem Genotyp 2 (17 %), drei Patienten waren mit dem Typ 3 infiziert (10 %). Bei zwei Patienten (7 %) zeigte sich eine Infektion mit mehreren verschiedenen HCV-Subtypen, ein Patient (3 %) war mit dem Typ 4 infiziert.

3 Therapieregime

Nachdem bei den Patienten eine chronische HCV-Infektion durch Antikörpernachweis und mehrfachen positiven HCV-RNA-Nachweis über mindestens 6 Monate gesichert war sowie der Nachweis einer entzündlichen Aktivität in der Leberbiopsie bestand, wurde nach Ausschluss von Kontraindikationen die Indikation zur IFN α -Therapie gestellt. Zu den absoluten Kontraindikationen für eine Therapie mit Interferon α gehören eine dekompensierte Leberzirrhose, Autoimmunerkrankungen, insbesondere autoimmune Hepatitis und Thyreoiditis, aktuelle Psychosen oder Depressionen, Thrombopenien unter 50.000/ μ l, Leukopenien unter 1.500/ μ l, Schwangerschaft, Leberzellkarzinom, symptomatische koronare Herzerkrankung, symptomatische Herzinsuffizienz (NYHA 3-4), Diabetes mellitus mit ausgeprägten Sekundärkomplikationen und funktionierendes Nierentransplantat (Diepolder, 2004; Zeuzem, 2004). Zu den Kontraindikationen für eine Therapie mit Ribavirin gehören Schwangerschaft und Stillzeit, schwere Herzerkrankungen, Hämoglobinopathien und Niereninsuffizienz mit einer Kreatininclearance unter 50 ml/min (Diepolder, 2004).

27 Patienten (71 %) erhielten eine IFN α -Monotherapie und 11 Patienten (29 %) erhielten im Zuge des neuen Therapieregimes eine Kombinationstherapie aus IFN α und Ribavirin. Die IFN-Dosis betrug zwischen drei und sechs Millionen Einheiten dreimal die Woche subkutan. Die Dauer der Therapie betrug abhängig von dem individuellen Ansprechen zwischen 3 und 14 Monaten (Mittelwert 8,8 Monate).

Die Therapien starteten in dem Zeitraum von Mai 1994 bis Februar 1997; wie bereits in der Einleitung erwähnt, gab es zu diesem Zeitpunkt noch keine PEG-Interferone, Ribavirin wurde nur im Rahmen von Studien verabreicht, einheitliche Therapieempfehlungen, wie sie jetzt vorliegen, gab es noch nicht, so dass die in unserer Studie verwandten Therapien nicht den jetzt aktuellen Therapiestandards entsprechen.

4 Gewebeproben

Die verwendeten Gewebeproben wurden im Rahmen der routinemäßigen diagnostischen Leberbiopsie vor einer geplanten Interferon-Therapie gewonnen. Die perkutanen Leberpunktionen wurden mit einer 1,4 mm Menghini-Punktionsnadel (Fa.

Braun, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Der Gewebezylinder wurde aufgeteilt, ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung für die PCR gelagert, der andere Teil wurde in Formalin fixiert und der routinemäßigen histologischen Untersuchung zugeführt. Die histologische Diagnostik der prätherapeutischen Leberbiopsie ergab bei allen Patienten Anzeichen einer chronischen Hepatitis mit milder bis mittelgradiger Entzündung, mittlerem histologischem Aktivitätsindex nach Knodell et al. (1981, siehe Einleitung) 4,66 und geringer Fibrosebildung (histologischer Fibrosescore 1,50).

5 RNA-Extraktion

Ein direkter Nachweis der Zytokine oder ihrer mRNAs ist wegen ihrer geringen Mengen nicht möglich. Daher erfolgte die semiquantitative Analyse der Zytokin-mRNA nach Extraktion der Gesamt-RNA aus den Leberbiopsien, Durchführung einer reversen Transkription und Vervielfältigung der mRNA mittels nachfolgender kompetitiver PCR. Die Analyse der mRNA-Spezies erlaubt einen Einblick in das intrahepatische Genexpressionsprofil zum Zeitpunkt der Biopsie.

5.1 Durchführung der RNA Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde nach der Ein-Schritt-Methode nach Chomczynski und Sachi (1987) extrahiert. Hierzu wurden die Biopsien in jeweils 500 μl Trizol (Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) homogenisiert, hierdurch wurden die Zellen zerstört und freigesetzte RNasen inaktiviert. Nach Zugabe von 100 μl Chloroform lösten sich genomische DNA und die Proteine in der Interphase und der organischen Phase, RNA löst sich aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhaltens in der wässrigen Oberphase. Die Oberphase wurde entfernt und die RNA mit Hilfe von 500 μl Isopropanol ausgefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 1300 rpm entstand ein Präzipitat, welches mit 1000 μl 75 %igem Ethanol gewaschen und schließlich getrocknet wurde. Schließlich wurde die extrahierte RNA in 30 μl RNase-freiem sterilem Wasser („Ampuwa“, Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst.

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde eine densitometrische

Bestimmung vorgenommen. Hierzu wurden 3 µl der RNA-Lösung mit 100 µl Wasser versetzt und die optische Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Mit Hilfe der Faustregel „1 OD (optische Dichte) Einheit bei 260 nm = 40 µg RNA / ml“ wurde die Konzentration der Probe abgeschätzt und anhand dieser Werte wurde die RNA-Lösung auf eine Konzentration von 2 µg / 30 µl eingestellt. Darüber hinaus gibt das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm einen Hinweis auf die Reinheit der RNA, wobei Werte von 1,7-2,0 erreicht werden sollten.

5.2 Entfernung möglicher Kontamination mit genomischer DNA

Da in dem RNA-Ansatz potentiell eine genomische DNA-Kontamination vorliegen kann, könnte es später, nach Durchführung der PCR, zu Unterscheidungsproblemen der Banden von cDNA und genomischer DNA kommen, wenn die Primersequenzen beide in demselben Exon liegen.

Ein Lösungsansatz besteht darin, beim späteren PCR-Produkt genomische DNA und cDNA dadurch voneinander zu unterscheiden, dass die Primer so gewählt werden, dass sie ein oder mehrere Introns innerhalb eines Gens überspannen. Dadurch wird das PCR Produkt, das durch die unerwünschte Amplifikation genomischer DNA entsteht, länger als das Produkt, welches durch die gewünschte Amplifikation von cDNA entsteht. Bei der Gelelektrophorese kann man hierdurch eine Kontamination mit genomischer DNA erkennen. Da genomische DNA jedoch bei der Amplifikation um Nukleotide, Primer und Enzyme konkurriert, würden trotz der späteren Unterscheidungsmöglichkeit die eigentlich gewünschten Sequenzen zu einem deutlich geringeren Ausmaß amplifiziert werden. Dies ist insbesondere dann relevant, wenn aufgrund niedriger mRNA-Mengen viele Amplifikationszyklen notwendig sind und führt insbesondere im Rahmen einer semi-quantitativen Untersuchung zu nicht verwertbaren Resultaten. Um das zu verhindern, besteht die Möglichkeit genomische DNA vor Durchführung der reversen Transkription enzymatisch durch eine DNase I, die frei von RNase-Aktivität ist, zu entfernen.

Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurden die Proben daher mit DNase I behandelt und zum Ausschluß eine Kontamination mit genomischer DNA eine sogenannte Minus-RT (-RT) durchgeführt (d.h. eine PCR mit allen Reagenzien für die reverse Transkription, jedoch ohne das Enzym Reverse Transkriptase). Hierzu wurde zu 1 µg

gewonnener RNA, 1 µl Puffer (10xDNase I Reaction Buffer, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) und 1 µl DNase (DNase I Amp Grade, 1U/l, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) zugefügt und mit sterilem Wasser („Ampuwa“, Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNase durch Zugabe von 1 µl EDTA-Lösung („EDTA solution“, 25 mM, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) inaktiviert und schließlich durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Nur Proben, bei denen in der Minus-RT PCR kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurden in die semiquantitativen Analysen einbezogen.

6 Polymerasekettenreaktion

6.1 Reverse Transkription

Bei der Polymerasekettenreaktion wird DNA als Ausgangsmatrize verwendet, daher muss die einzelsträngige RNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Das hierbei verwendete Enzym, die reverse Transkriptase, ist ein rekombinant hergestelltes Enzym aus RNA-Tumorviren.

Um die cDNA-Synthese zu starten, muss man Starter-DNA (sogenannte Primer) verwenden, die sich an den RNA-Strang anlagern und so die reverse Transkription initiieren. Es gibt drei verschiedene Arten von Primern: Zum einen kann man genspezifische Primer verwenden. Hierbei entsteht nur eine genspezifische cDNA, so dass später nicht die Möglichkeit besteht, verschiedene mRNA durch die PCR nachzuweisen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Effizienz (Freeman et al., 1999). Soll die gesamte Population der mRNA-Moleküle transkribiert werden, muss man entweder Oligo(dt)-Primer oder Random-Primer verwenden (Freeman et al., 1999; Vosberg, 1989). Bei Oligo(dt)-Primern verwendet man Oligonukleotide mit Längen zwischen 12 und 18 Nukleotiden, die sich an das Poly-A-Ende der mRNA anlagern, so dass die komplette Population der mRNA-Moleküle transkribiert wird. Da allerdings vom 5´Ende gelesen wird, werden am 3´Ende liegende PCR-Produkte weniger effizient transkribiert und somit später auch weniger amplifiziert, was für die semiquantitative Analyse problematisch ist. Randomprimer bestehen aus kurzen Oligonukleotiden, typischerweise

Hexameren, die in randomisierter Nukleotidsequenzfolge synthetisiert werden und alle möglichen Nukleotide an allen Positionen besitzen. Dadurch lagern sie sich zufallsmäßig an die RNA-Moleküle an und initiieren die cDNA-Synthese. Diese Methode ist zwar weniger effizient, dafür erhält man aber eine relativ gleichmäßige reverse Transkription von sehr unterschiedlichen Sequenzen, zusätzlich werden durch diese Methode die Effekte von mRNA-Sekundärstrukturen minimiert (Noonan und Roninson, 1988).

Wir entschieden uns für die Verwendung von Randomprimern, da in den Proben die mRNA von unterschiedlichen Zytokinen nachgewiesen werden sollten. Außerdem war eine gleichmäßige Transkription der unterschiedlichen Sequenzen notwendig, da eine semi-quantitative Untersuchung geplant war.

Zur Durchführung der cDNA-Synthese wurden zu 11 µl der RNA-Probe 1 µl Randomprimer (Fa. Promega, Mannheim, Deutschland) hinzugegeben und dieses zehn Minuten bei 72°C inkubiert, so dass vor allem die RNA denaturiert wurde und sich eventuell vorhandene Tertiärstrukturen lösten, die eine Bindung des Primers erschweren könnten; danach können sich die Primermoleküle an die mRNA-Ketten anlagern.

Alle Primer waren so gewählt, dass sie Intron-Exon-Grenzen überspannen, also genomische Kontamination zur Amplifikation eines größeren Fragments führen würde.

Nach Anlagerung der Primer wurden insgesamt 1 µl der vier benötigten Nukleotide (Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytosintriphosphat, Desoxyguanintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat, 10 mM, Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland), 4 µl Puffer (‘5X First strand buffer’, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) und schließlich 1 µl der reversen-Transkriptase (‘Superscript II RT’, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) zugegeben und kurz zentrifugiert. Der Ansatz wurde 45 min bei 42°C und anschließend 30 min bei 55°C inkubiert, so dass die reverse Transkription stattfinden konnte. Schließlich wurde die entstandene cDNA 1:2,5 verdünnt, in Einzelproben zu 2,5 µl aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

6.2 Prinzip der PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur

Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro*. Hierzu benötigt man zwei Oligonukleotid-Primer, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren, sowie wiederholte Zyklen der Doppelstrangdenaturierung, des Anlagerns der Primer-Moleküle an ihre komplementären DNA-Sequenzen und der Extension der Primer mit Hilfe der DNA-Polymerase. Das entstandene Amplifikat wird jeweils zur Ausgangsmatrize im folgenden Zyklus. Diese drei Teilschritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen, führen also theoretisch zu einer exponentiellen Amplifikation der Menge der DNA-Segmente (Abbildung 2).

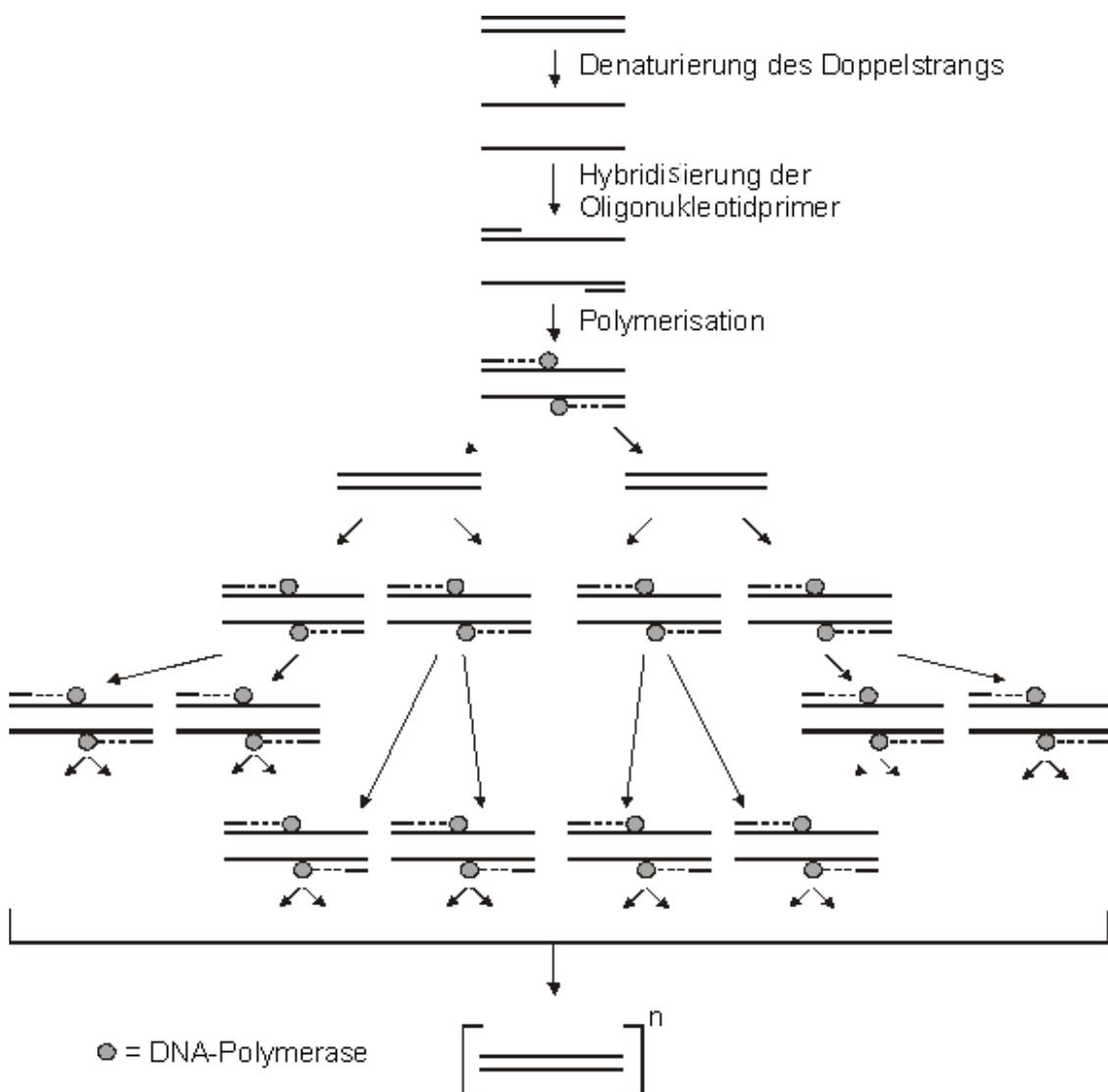


Abb. 2: Prinzip der exponentiellen Amplifikation der DNA Segmente bei der Polymerasekettenreaktion, Abbildung nach Lachmund und Sachse (Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In: Gassen, Sachse, Schulte, Hrsg.. PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion).

Unter normalen experimentellen Bedingungen ist keine 100 %ige Verdopplung der Moleküle zu erwarten, man kann von einer ungefähren Effektivität von 85 % ausgehen (Saiki et al., 1985). Die Anzahl der spezifischen DNA-Moleküle wächst also ungefähr exponentiell mit der Zykluszahl, nach über 25 Zyklen ist aufgrund der sinkenden Effizienz nur noch eine lineare Zunahme oder ein Plateau zu beobachten (Abbildung 3 und 4).

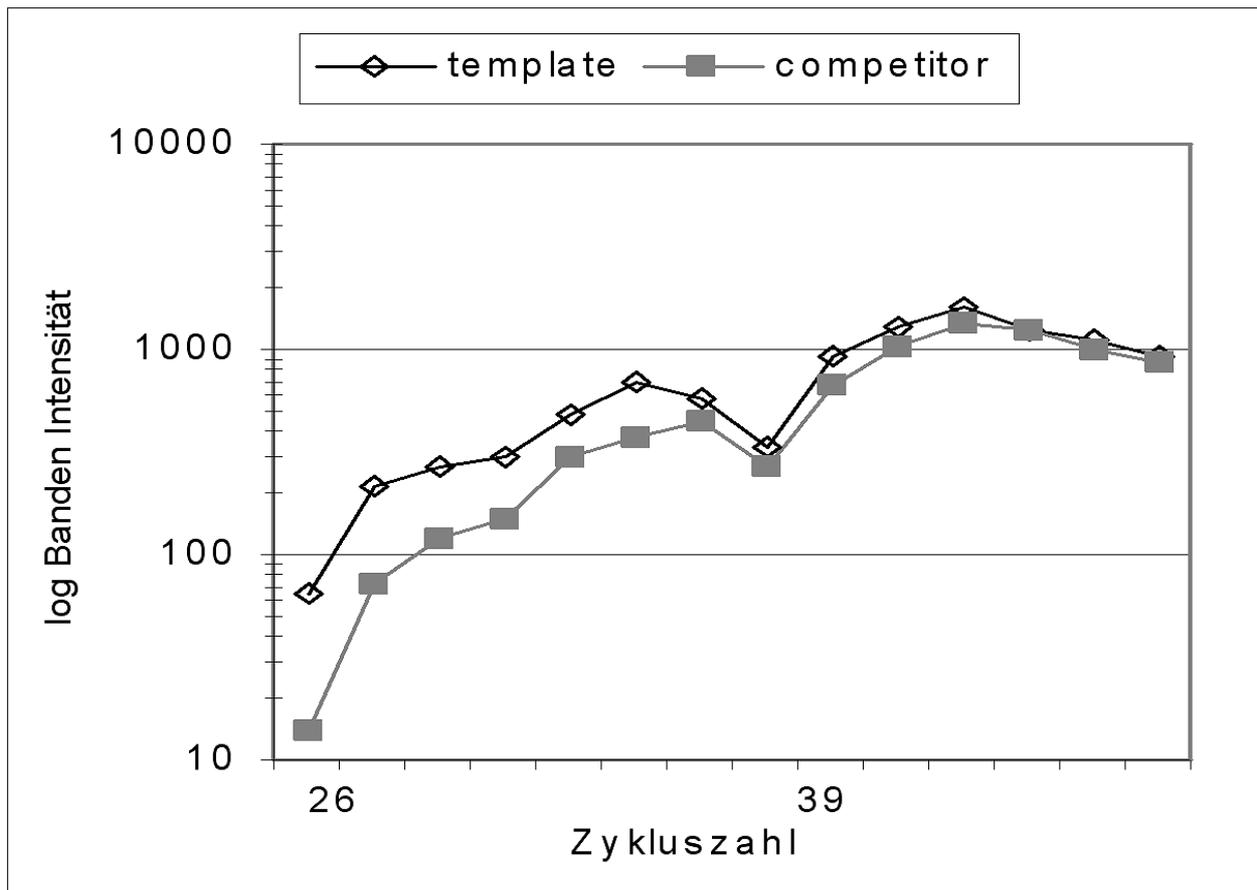


Abb. 3: Darstellung der Bandenintensität von Kompetitor und Template aus Abb. 4: Koamplifikation äquivalenter Mengen Kompetitor (untere Reihe KF1- künstlich synthetisiertes, heterologes DNA-Fragment, freundlicherweise von C. Platzer zur Verfügung gestellt; Verdünnung 1:12) und Template (IFN γ , obere Reihe) nach 21 bis 39 Zyklen.

Diese Plateauphase tritt auf, weil einerseits mit einer steigenden Produktmenge die vorhandene Enzymmenge nicht mehr in der Lage ist, die Amplifikation aller vorhandenen Substrate vollständig zu katalysieren, andererseits nimmt mit steigender Anzahl der abgelaufenen Temperaturzyklen die Enzymaktivität ab (Saiki et al., 1988).

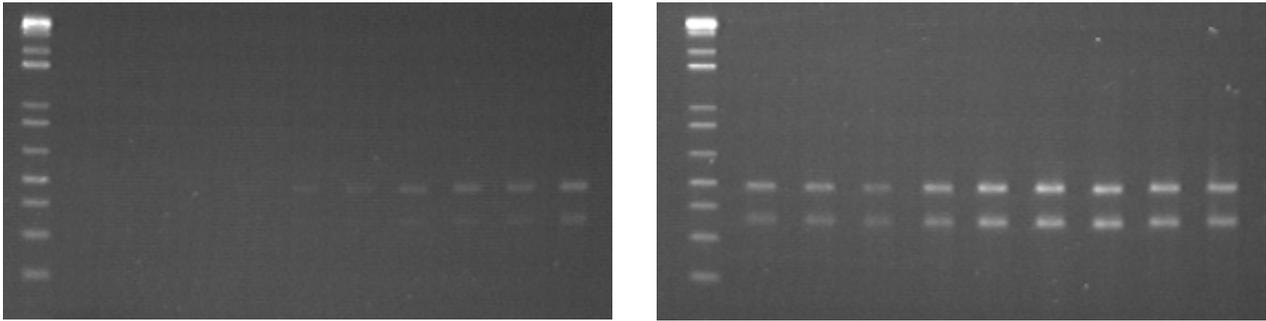


Abb. 4: Koamplifikation äquivalenter Mengen Kompetitor (KF1-Verdünnung 1:12, untere Reihe) und Template (IFN γ , obere Reihe) nach 21 bis 39 Zyklen

Die Kombination aus einer reversen Transkription, gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion bezeichnet man als RT-PCR, diese Technik ist 1.000 bis 10.000 mal sensitiver als traditionelle RNA-Hybridisierungs-Techniken wie etwa RNase protection assay (RPA) oder Northern Blot mit oder ohne poly A+ mRNA-Selektionierung (Übersichtsarbeit Siebert und Larrick, 1992). Dadurch besteht die Möglichkeit mRNA in sehr geringen Mengen nachzuweisen, wie das bei mRNA von Zytokinen notwendig ist.

6.3 Sensitivität und Spezifität der PCR

Die Effizienz und Spezifität einer PCR kann durch die folgenden Faktoren beeinflusst werden.

Temperaturprofil der PCR-Zyklen:

Je höher die Temperatur in der Anlagerungs-Phase ist, desto spezifischer ist die Primeranlagerung, eine niedrigere Temperatur kann aber bewusst gewählt werden, wenn zum Beispiel die Übereinstimmung zwischen Primer und Ziel-DNA nicht 100 %ig ist.

Konzentration der zugegebenen Nukleotide, Primer, Magnesium und DNA-Polymerase:

Magnesium beeinflusst die Enzymaktivität, erhöht den Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA und bildet lösliche Komplexe mit den dNTPs, um somit das Substrat für die Polymerase zu bilden. Ein Ungleichgewicht in der Mischung der dNTPs führt zu einer geringeren Polymerasegenauigkeit, hohe Konzentrationen der dNTPs stören die

Aktivität der Polymerase und haben Einfluss auf die Primeranlagerung durch die Senkung der freien Magnesiumkonzentration (Bustin, 2000; Saiki et al., 1988; Templeton, 1992; Wang et al., 1989).

Dauer der Synthesephase:

Mit der Länge der Extensionszeit erhöht sich der Anteil nicht spezifischer PCR-Produkte (Saiki et al., 1988).

Länge und Lage des zu amplifizierenden DNA Abschnitts:

Eine Länge über 2,0 kb führt zu einer sinkenden Effizienz und Ausbeute der PCR (Saiki et al., 1988). Auch die Lage des zu amplifizierenden Abschnitts kann Einfluss auf die Effizienz einer Polymerasekettenreaktion haben, so sind G-C-reiche Regionen generell schwierig zu amplifizieren, auch eine komplexe Sekundärstruktur des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts führt bereits bei der cDNA-Synthese zu einer geringeren Sensitivität und Spezifität (Mitsubishi, 1996).

Primersequenz:

Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Primer deutlich in ihrer Effizienz unterscheiden (Wang et al., 1989). Eine Primeranlagerungstemperatur unter 55°C führt zu der Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten, wohingegen eine Temperatur über 58°C zwar die Spezifität der Amplifikation verbessert, jedoch die Amplifikationseffizienz verringert. Die optimale Temperatur für die Primeranlagerung ist aber abhängig von der Länge der Primer sowie dem Gehalt an A-T-bzw. G-C-Basenpaaren (Wu et al., 1991). Eine Primerlänge zwischen 20 und 30 Basenpaaren hat sich bei vielen PCR als erfolgreich erwiesen, außerdem die Verwendung von Primern mit einem annähernd gleich verteilten Verhältnis der vier Basen. Weiterhin können Sekundärstrukturen innerhalb der Primer Einfluss auf die Sensitivität der PCR haben (Mitsubishi, 1996).

6.4 Methodische Probleme der (semi-) quantitativen PCR

Da durch den exponentiellen Charakter der DNA-Amplifikation, gemeinsam mit der geringen Ausgangsmenge von Ziel-Molekülen, schon geringe Unterschiede in der

Amplifikationseffizienz erhebliche Auswirkungen auf die Produktmenge haben, ist es schwierig, quantitative Informationen zu erhalten. Wenn man mehrere PCR durchführt, deren Ergebnisse miteinander verglichen werden sollen, kann eine Variation der oben genannten Faktoren zu erheblichen Veränderungen der Produktmenge führen. Dies gilt insbesondere auch deshalb, weil es bei der konventionellen Endpunktmessung schwierig ist zu verhindern, dass die ausgewerteten Daten während der Sättigungsphase der PCR gewonnen werden und so ein Rückschluss auf die Ausgangsmenge der Ziel-Moleküle unmöglich werden kann. Das kann dazu führen, dass anfangs bestehende Unterschiede in der Menge der Zielsequenz im Laufe der Amplifikation völlig verwischt werden (Freeman et al., 1999; Siebert und Larrick, 1992; Wang et al., 1989) und somit keine quantitative, sondern allenfalls eine qualitative Aussage möglich ist. Aber nicht nur Unterschiede in der Effizienz der PCR haben Einfluss auf das Ergebnis der semiquantitativen PCR, sondern natürlich auch Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bezüglich RNA-Extraktion und Effizienz der cDNA-Synthese (Freeman et al., 1999), insbesondere da es sich um Proben unterschiedlicher Individuen handelt.

6.5 Vorteile der kompetitive (RT) PCR

Das Problem der fehlenden Quantifizierbarkeit lässt sich durch die Verwendung interner Kontrollen zumindest teilweise lösen. Bei der kompetitiven PCR wird ein DNA-Fragment (Kompetitor) verwendet, das dieselbe Primer-Bindungssequenz wie die zu vervielfältigende Sequenz hat. Dadurch konkurriert dieses Fragment mit dem DNA-Abschnitt um Primer-Bindung und Amplifikation. Voraussetzung für eine kompetitive PCR ist, dass das Ziel-Gen und der DNA-Kompetitor mit derselben Effizienz vermehrt werden. Wie bereits oben beschrieben, gibt es verschiedene Faktoren, die Einfluss auf die Effizienz der PCR haben. Durch die Verwendung derselben Primer und gleichzeitiger Amplifikation unter denselben Reaktionsbedingungen lässt sich ein Großteil dieser Faktoren neutralisieren. Es hat sich mehrfach gezeigt, dass so die Amplifikationseffizienz auch bei der Verwendung heterologer Kompetitorfragmente zwischen Kompetitor und Ziel-DNA gleich ist (Bouaboula et al., 1992; Dumoulin et al., 1997a; Wang et al., 1989), es sei denn, es lägen signifikante Unterschiede in der Denaturations- oder der Polymeraseverlängerung wegen eines hohen G-C-Gehalt oder dem Vorliegen

von Sekundärstrukturen vor (Siebert und Larrick, 1992). In den Abbildungen 3 und 4 zeigt sich eine bis in den Sättigungsbereich der PCR reichende gleiche Amplifikationseffizienz für den hier verwendeten Kompetitor und IFN γ nach einer unterschiedlichen Anzahl von Amplifikationszyklen. Eine Unterscheidung der entstehenden PCR-Produkte kann durch Einfügen von Bindungsstellen für Restriktionsenzyme oder durch eine unterschiedliche Länge von Kompetitor und Ziel-DNA erzielt werden (Abb.4), wobei wichtig ist, dass zwar sichtbare Längenunterschiede zwischen den zu amplifizierenden Fragmenten bestehen, diese aber für die Effizienz der PCR irrelevant sind. Durch die Verwendung einer solchen internen Kontrolle, bei der bekannte Mengen Kompetitor zur DNA-Probe hinzugegeben werden, lassen sich Rückschlüsse auf die ursprüngliche Menge der amplifizierten Sequenz ziehen (Bustin, 2000; Übersichtsarbeit Siebert und Larrick, 1992). Um Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu korrigieren kann man eine interne Normierung verwenden. Als diese internen Bezugsgrößen verwendet man sogenannte „housekeeping genes“, hierbei handelt es sich um Gene, die idealerweise in praktisch jeder Zelle zu einem annähernd gleichen Maße exprimiert werden, keiner gewebe- oder stadienspezifischen Regulation unterliegen und für Moleküle kodieren, die für die Basisversorgung der Zelle und essentielle Zellfunktionen notwendig sind. Außerdem sollten diese Gene nicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst werden und in ungefähr derselben Größenordnung wie die zu untersuchende mRNA exprimiert werden, so dass ihre Menge mit der Ausgangsmenge der Gesamt-mRNA korreliert (Bustin, 2000).

6.6 Angewandte semiquantitative Methode

Bei den von uns verwendeten Kompetitor-Kontrollfragmenten handelt es sich um heterologe DNA-Moleküle, die verschiedene Primer-Sequenzen enthalten (Platzer et al., 1994; Abbildung 5). Während Platzer et al. zu einer Probe unbekannter Menge verschiedene Konzentrationen des Kontrollfragments geben, um schließlich die Konzentration zu erhalten, bei der äquivalente Mengen der PCR-Produkte vorliegen, also der Äquivalenzpunkt durch Durchführung mehrerer PCR titriert wird, haben wir hier eine in unserem Labor entwickelte Modifikation verwendet (Dumoulin et al., 1997a). Es wurden konstante Kompetitormengen zu unterschiedlichen cDNA-Proben gegeben.

Diese Methode hat verschiedene Vorteile: Die Anzahl der benötigten Untersuchungen wird reduziert. Beim Titrationsverfahren benötigt man 6-10 Titrationsstufen pro Probe, hier wurden pro analysierter Zielsequenz lediglich zwei PCR-Ansätze durchgeführt. Außerdem erlaubt die Verwendung derselben Kompetitorkonzentration (‘master standard’) eine gute Vergleichbarkeit der semiquantitativ ermittelten Werte miteinander. Zu den am häufigsten verwandten konstitutiv exprimierten Genen (sog. „housekeeping genes“) als interne Kontrollen gehören beta-Actin und Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase (GAPDH). Dumoulin et al. (1997a) haben gezeigt, dass die Expression der beiden mRNAs von beta-Actin und GAPDH in der Leber bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion, HBV-Infektion, PBC sowie bei normalen Kontrollen ähnlich sind, so dass wir uns in dieser Untersuchung auf die GAPDH-Werte beschränkten. Um eine Kontamination mit genomischer DNA oder PCR-Produkten auszuschließen, wurden entsprechende Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurde einerseits von den Proben der sogenannten Minus RT (s. o.) eine PCR durchgeführt, um eine genomische Kontamination auszuschließen, andererseits gab es bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne cDNA, um mögliche spätere DNA-Kontaminationen zu entdecken. Die Zytokin-mRNA-Werte wurden schließlich zu den GAPDH-Werten der Proben in Relation gesetzt, um Unterschiede in der Effizienz der RNA-Extraktion und reversen Transkription zu korrigieren.

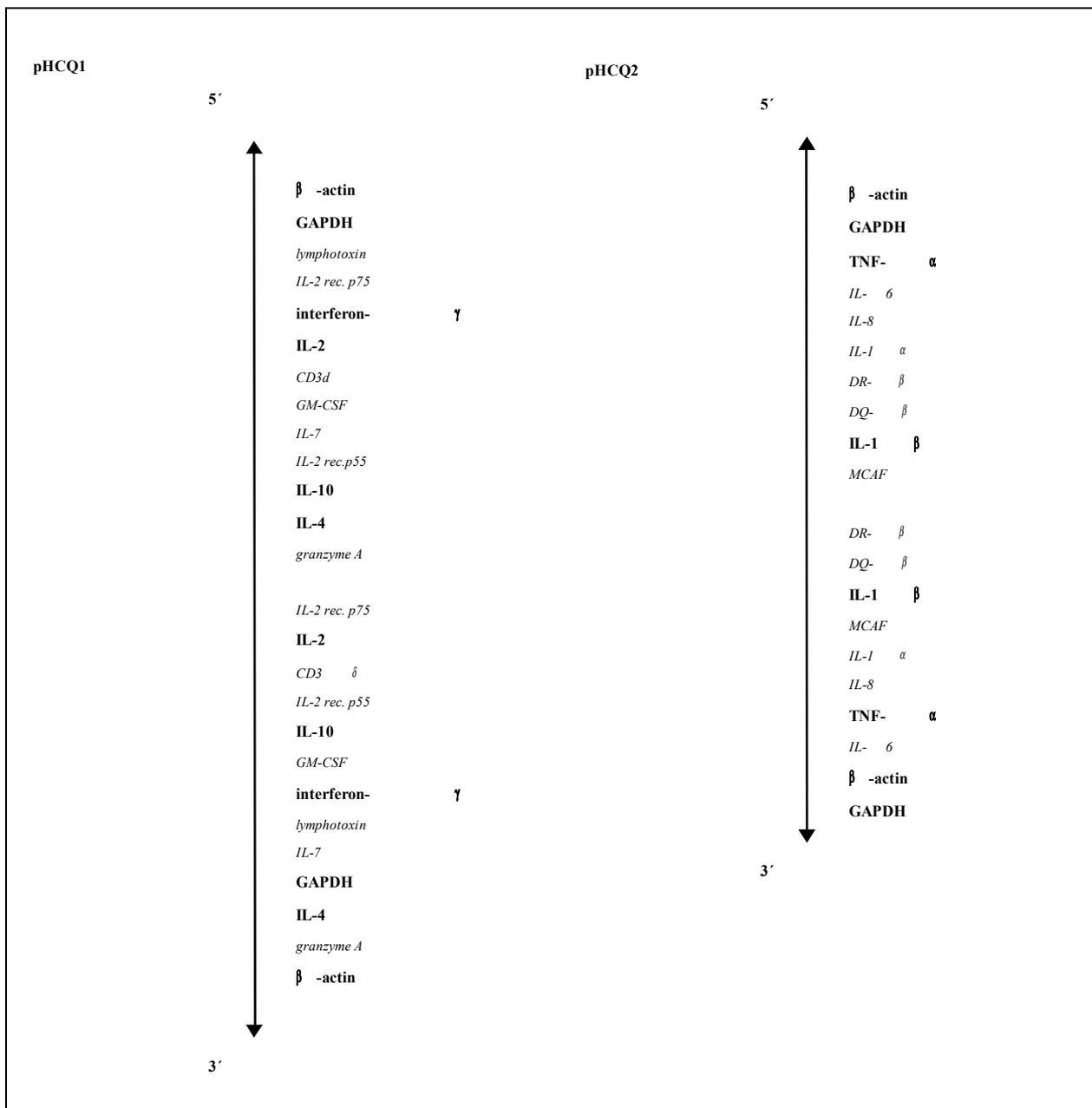


Abb. 5: Heterologe multispezifische Kompetitor-Fragmente nach Platzer et al.

6.7 Durchführung

Der Reaktionsansatz für die PCR betrug jeweils 25 μ l, zu 2,5 μ l cDNA-Probe wurden jeweils 2,5 μ l d’NTP-mix (Mischung der 4 Nukleotide d’ATP, d’GTP, d’CTP und d’TTP zu jeweils gleichen Teilen, 2,5 mM, Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland), 1 μ l Oligonukleotidprimer (nach eigenen Angaben gefertigt, Fa. MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland, siehe Abb. 6), 0,1 μ l hitzestabile Polymerase („Amplitaq“, 5U/ μ l, Fa. Perkin

Elmer, Boston, USA), 1 µl Kompetitor (zur Verfügung gestellt von C. Platzer, Universität Jena, Deutschland), 2,5 µl Puffer (reaction buffer 10x, Fa. Perkin Elmer, Boston, USA) und 15,4 µl nukleasefreies Wasser („Ampuwa“, Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) hinzugegeben:

2,5 µl	cDNA-Probe
2,5 µl	d’NTP-mix
1,0 µl	Oligonukleotidprimer
0,1 µl	Polymerase
1,0 µl	Kompetitor
2,5 µl	Puffer
15,4 µl	nukleasefreies Wasser
25,0 µl	Reaktionsansatz

Tab. 10 : PCR-Reaktionsansatz

Die Proben wurden mit Paraffin (Paraffinum subliquidum p.a., Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet und durchliefen im Thermozykler (Trio-Thermoblock und Trio Heated Lid, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) folgendes Temperaturprofil (siehe Tab. 11): Denaturierung 240 sec. bei 94°C, Hybridisierung der Primer 120 sec. bei 60°C, Synthesephase 120 sec. bei 72°C, Denaturierung 60 sec. bei 94°C und Hybridisierung der Primer 60 sec. bei 60°C; die Schritte 3 bis 5 wurden je nach PCR-Produkt in 27 (GAPDH), 35 (IFN) oder 37 (TNF) Zyklen wiederholt, gefolgt von einer letzten langen Synthesephase von 360 sec. bei 72°C.

1	94°C	240 sec.	Denaturierung
2	60°C	120 sec.	Hybridisierung
3	72°C	120 sec.	Synthesephase
4	94°C	60 sec.	Denaturierung
5	60°C	60 sec.	Hybridisierung
6	72°C	360 sec	Synthesephase

Tab. 11: Temperaturprofil der PCR

TNF α	IFN γ
5'- CTC TGG CCC AGG CAG TCA GA-3'	5'-TCG TTT TGG GTT CTC TTG GC-3'
5'- GGC GTT TGG GAA GGT TGG AT-3'	5'-GCA GGC AGG ACA ACC ATT AC-3'
GAPDH	
5'-GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG-3'	
5'-TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG-3'	

Abb. 6: Sequenzen der verwendeten Primer

6.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können die DNA-Stränge nach ihrer Größe getrennt werden. Durch ein elektrisches Feld werden die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix zur Anode gezogen, wobei sich die kleineren Moleküle schneller bewegen. Durch die Konzentration des Gelbildners kann die Porengröße genau an die Größe der zu trennenden Moleküle angepasst werden. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn die kleinsten Moleküle annähernd das Ende des Gels erreicht haben, um so eine höchstmögliche Auftrennung der Moleküle zu erzielen. Da die DNA-Moleküle während der Elektrophorese nicht sichtbar sind, wird vorher ein Farbmarker hinzugegeben um den Fortschritt der Elektrophorese zu beobachten. Zur Identifizierung der PCR-Produkte werden die Amplifikate gleichzeitig mit einem Längenstandard (Kilobasen-Leiter), das ist eine Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge, aufgetrennt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte mit einem farbstoffhaltigen Ladepuffer versetzt und auf ein 2 %iges Agarosegel (Agarose, Fa. GIBCO, Eggenstein, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 15 min. bei 60 mA und für weitere 45 min. bei 120 mA in einer mit TAE-Puffer gefüllten Mini-Elektrophoresekammer (Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland) über eine Laufstrecke von 20 cm.

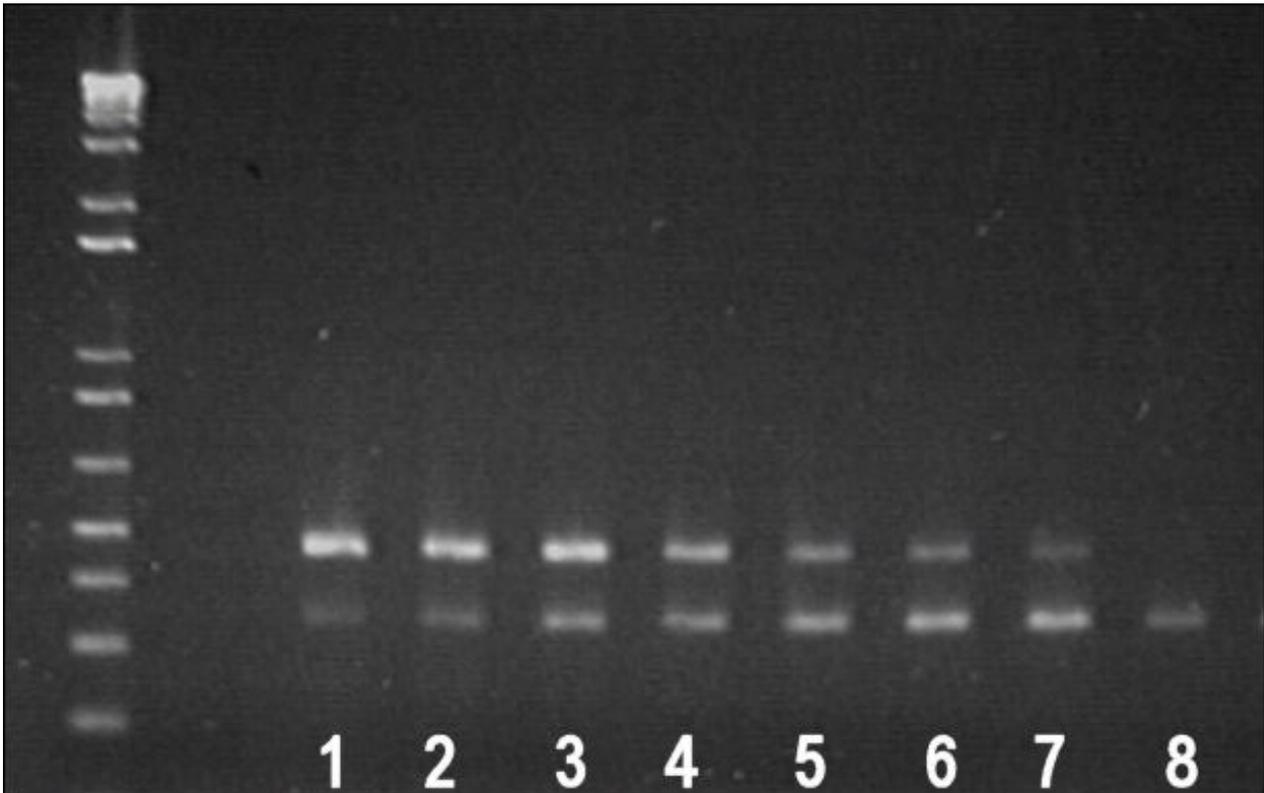


Abb. 7: 1:2 Verdünnungsreihe des Template (IFN γ , obere Reihe) bei konstanter Kompetitor-Konzentration (KF1Verdünnung1:12), Äquivalenzpunkt bei Position 5; Position 8 Negativkontrolle, ohne cDNA

Um das aufgetrennte PCR-Produkt sichtbar zu machen, muss eine Färbung, zum Beispiel mit Ethidiumbromid, erfolgen, welches mit DNA-Molekülen interkaliert und unter UV-Licht sichtbar wird. Daher wurde das Gel anschließend für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 % ‚ultra pure Ethidium Bromid Solution‘, Fa. GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) gefärbt. Dann wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit Hilfe eines Video-Systems photographiert, als TIFF-Datei gespeichert und schließlich unter Verwendung eines densitometrischen Software-Systems (Fa. Intas, Göttingen, Deutschland) analysiert.

6.9 Auswertung

Die densitometrische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (‚Cream 4,1‘, Fa. KEM-EN-TEC Software Systems, Dänemark). Hierbei wurde die Intensität der zuvor unter UV-Licht sichtbar gemachten und entsprechend gespeicherten Banden densitometrisch erfasst. Die Größe und

Farbintensität der Banden ist proportional mit der Molekülmenge, daher erlaubt eine densitometrische Erfassung dieser Daten eine semiquantitative Aussage. Da bei der von uns angewandten Methode zur Quantifizierung nur ein eingeschränkter Messbereich valide ist – die Proportionalität der densitometrisch ermittelten Bandenintensitäten von Ziel-DNA und Kompetitor besteht nur in einem Bereich von 10:1 und 1:10 (Dumoulin, 2000) – wurde vor Durchführung der PCR eine Titration mit verschiedenen Proben und unterschiedlichen Kompetitormengen durchgeführt, um den ungefähren Äquivalenzpunkt zu bestimmen und die später verwendete KompetitorKonzentration an die zu erwartende Zytokinmenge anzupassen (Abb. 7).

Die densitometrisch erfassten Daten wurden als Kurvenfunktion dargestellt und schließlich durch Integration als Zahlenwert ausgedrückt.

Um zufällige Unterschiede zwischen den einzelnen PCR möglichst gering zu halten, wurde für jedes untersuchte Produkt die PCR zweimal durchgeführt und von jeder PCR zwei Gelelektrophoresen und densitometrische Auswertungen gemacht. Aus den entstandenen Daten wurden die Mittelwerte berechnet.

7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Tabellenkalkulationsprogrammen (Microsoft Excel, SPSS plus für Windows). Bei der Festlegung des Therapieerfolgs wurde zwischen langfristigem Therapieerfolg („sustained virological response“, SVR) und Nicht-Ansprechen („non-response“, NR) und Rückfall nach Abschluss der Therapie („relapse“, RP) und Rückfall unter der Therapie („breakthrough“, BT) unterschieden. Bei unserer Untersuchung wurde der Therapieerfolg virologisch festgestellt, also durch Nachweis von HCV-RNA im Blut, im Gegensatz zur biochemischen Definition des Ansprechens, der durch eine Normalisierung der Transaminasen charakterisiert ist.

Als „Nicht-Ansprechen“ werden Patienten bezeichnet, die unter der Interferon-Therapie stets einen positiven HCV-RNA-Nachweis im Blut haben, also virologisch gesehen nicht auf die Therapie ansprechen. Unter „Rückfall“ werden die Patienten zusammengefasst, die auf die Therapie kurzzeitig ansprechen, aber entweder noch während der Interferon-Therapie (BT) oder nach Abschluss der Therapie (RP) erneut einen Virusnachweis im

Blut bieten. Als langfristigen Therapieerfolg werden die Patienten bezeichnet, die auch sechs Monate nach Therapieabschluss kein erneutes Auftreten einer Virämie im Blut zeigen. Diese Patienten haben eine signifikant bessere Langzeitprognose, die Wahrscheinlichkeit für ein Wiederauftreten einer Virämie ist gering (Lindsay, 1997; Reichard et al., 1999; Yoshida, 2002).

Sofern nicht anders angegeben, sind die Daten im Folgenden als Mittelwerte / Standardabweichung aufgeführt; in der Regel wurde ein Student t-Test für unpaarige Stichproben gerechnet (Microsoft Excel 2000), nachdem auf eine Normalverteilung der Werte geprüft worden war. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Bei der Untersuchung der statistischen Signifikanz von Patientencharakteristika auf ein Therapieansprechen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

III. Ergebnisse

1 Klinischer Therapieerfolg

22 der 35 Patienten (62 %) sprachen initial auf die Interferon-Therapie an, allerdings zeigten sechs Patienten noch unter der Therapie ein erneutes Auftreten der Virämie im Blut (HCV-PCR positiv, sogenannter „breakthrough“, BT) und weitere fünf Patienten wurden nach Abschluss der Interferon α -Therapie in einem Zeitraum von 1 bis 6 Monaten (Mittel 2,6 Monate) wieder HCV-PCR positiv („relapse“, RP). Also sprachen langfristig (Beobachtungszeitraum 4 bis 18 Monate, Mittel 8,2 Monate) nur 11 Patienten (31 %) auf die Therapie an („sustained virological response“, SVR). 13 Patienten (37 %) boten nicht einmal ein kurzfristiges Ansprechen auf die Interferon-Therapie („non-response“, NR).

In Langzeitbeobachtungen von Patienten, die auf eine Interferon-Therapie ansprachen, hat sich gezeigt, dass die Patienten, die auch noch sechs Monate nach Therapieende ein virologisches und biochemisches Ansprechen zeigen (SVR), eine sehr gute Langzeitprognose haben. Die Wahrscheinlichkeit, nach dieser Zeit wieder einen erneuten Ausbruch der Virämie zu haben sind ausgesprochen gering, eine langfristige Besserung der klinischen, histologischen und biochemischen Parameter ist zu beobachten (Lindsay, 1997; Reichard et al., 1999). Auch nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten wird als primäres Therapieziel einer antiviralen Therapie der fehlende HCV-RNA-Nachweis im Serum 6 Monate nach Therapieende definiert (Zeuzem, 2004).

Daher haben wir die Patienten in den folgenden Beobachtungen in zwei Gruppen aufgeteilt, Gruppe A enthält die Patienten, die auch im nachfolgenden Beobachtungszeitraum keine Anzeichen eines erneuten Auftretens der Virämie boten (SVR), in Gruppe B haben wir die Patienten, die nur einen vorübergehenden Nutzen von der Therapie hatten (RP, BT), und die, die gar nicht auf die Interferon-Therapie ansprachen (NR), zusammengefasst.

Gruppe A	sechs Monate nach Therapieende HCV-RNA negativ (langfristiges Therapieansprechen, sustained virological response / SVR)
Gruppe B	sechs Monate nach Therapieende HCV-RNA positiv (non-SVR) (komplettes Nichtansprechen; HCV-RNA wieder positiv nach initialem Ansprechen)

Tab. 12: Stratifizierung bezüglich des langfristigen Therapieerfolges

2 Bedeutung verschiedener patientenseitiger, therapiebedingter und virologischer Faktoren für das Therapieansprechen

Das Durchschnittsalter betrug bei Patienten mit SVR 40,4 Jahre und bei den übrigen Patienten 42,9 Jahre ($p = 0,68$, Student t-Test). Zwischen dem Alter der Patienten und dem Ansprechen zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang, allerdings scheint mit steigendem Alter die Wahrscheinlichkeit abzunehmen, auf die Therapie anzusprechen.

Biochemisch zeigte sich folgende Verteilung der Leberwerte zwischen Gruppe A und B: Die Durchschnittswerte für GPT, GOT und γ -GT betragen bei Gruppe A: 54 U/l, 25 U/l und 21 U/l, bei Gruppe B: 65 U/l, 35 U/l und 35 U/l ($p = 0,38$; $p = 0,13$; $p = 0,08$, Student t-Test). Obwohl die biochemischen Leberparameter bei Patienten ohne langfristiges Therapieansprechen insgesamt höher sind, fehlt eine statistische Signifikanz.

Zur Gruppe A gehörten 2 Frauen (18 %) und 9 Männer (82 %), Gruppe B setzt sich aus 9 Frauen (37,5 %) und 15 Männern (62,5 %) zusammen. Anhand des Chi-Quadrat-Test ergibt sich, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Verteilung des Therapieausgangs hat.

Die Viruslast wurde prätherapeutisch bei 8 der 11 Patienten aus Gruppe A bestimmt, die Werte lagen zwischen 21.750 und 2.177.419 Kopien / ml, mit einem Mittel von 658.421 Kopien / ml (Stabw. 691.823). Bei Gruppe B erhielten 18 der 24 Patienten eine

Bestimmung der Viruslast, hier lag das Mittel bei 2.065.890 Kopien / ml (Stabw. 1.853.661) (34.288 bis 6.474.056 Kopien / ml). Bei der statistischen Auswertung ergibt sich hierbei eine Signifikanz ($p = 0.0098$, Student t-Test).

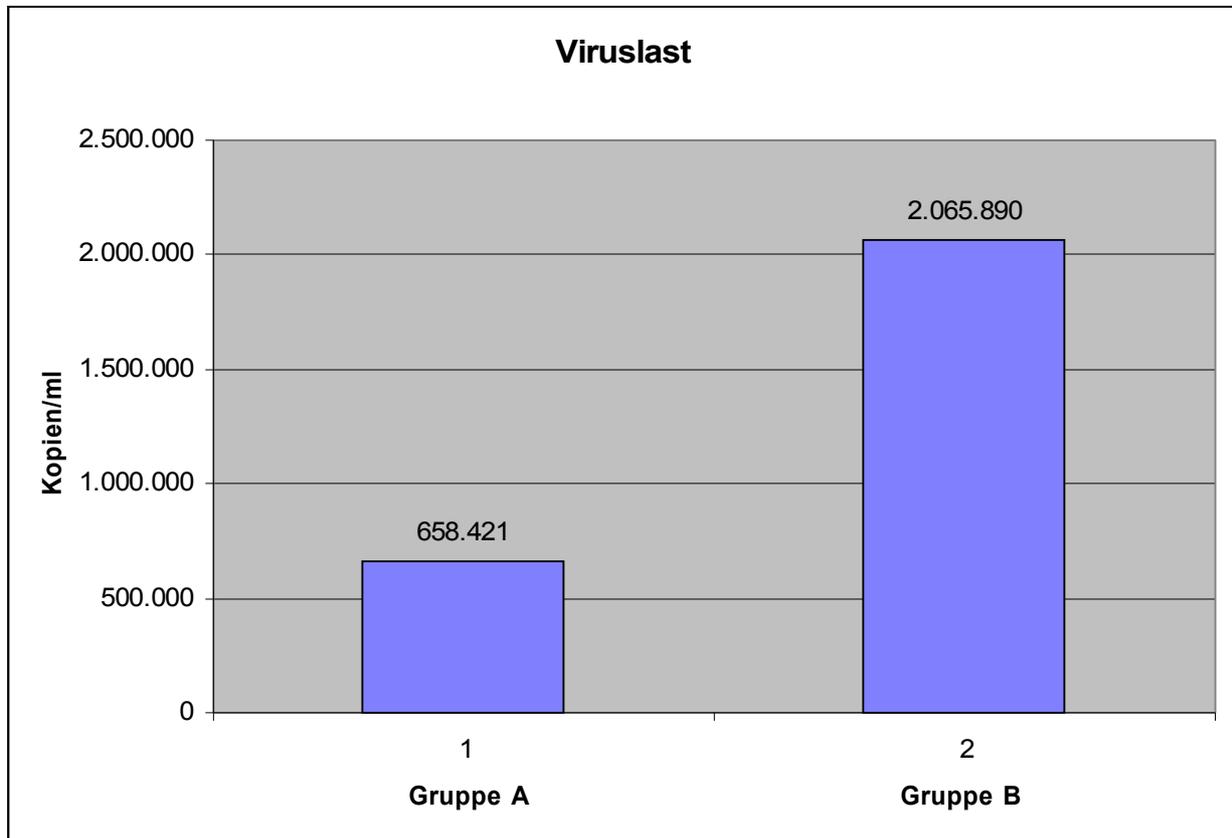


Abb. 8: Mittlere prätherapeutische Viruslast

Bei 29 der 35 Patienten (83 %) wurde prätherapeutisch der Genotyp bestimmt. Dabei zeigte sich folgende Verteilung: 27 % der mit dem Genotyp 1 infizierten Patienten boten einen langfristigen Therapieerfolg, 73 % waren Nicht-Ansprecher. Bei den mit dem Genotyp 2 infizierten Patienten war die Verteilung folgendermaßen: 60 % sprachen auf die Interferon α -Therapie langfristig an und die übrigen 40 % gehörten zur Gruppe B. Der Genotyp 3 zeigte sich zu 33 % bei Angehörigen der Gruppe A und zu 66 % bei denen der Gruppe B. Der Genotyp 4, der nur einmal vertreten war, zeigte sich bei einem Patienten, der nicht auf die Interferon-Therapie ansprach. Da man heute sowohl bezüglich der Therapieregime als auch bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs nur zwischen Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind, und

solchen, die mit einem anderen Virusgenotyp infiziert sind, unterscheidet, haben auch wir diese Unterscheidung vorgenommen. Also sprachen 44 % der nicht mit Genotyp 1 Infizierten langfristig auf eine Interferon α -Therapie an, 56 % zeigten keinen langfristigen Therapieerfolg, hier ergibt sich kein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test). Eine Mischinfektion mit mehreren HCV-Typen (1+2 und 2+3) zeigte sich bei zwei Patienten aus Gruppe B. Unspezifisch in dem verwandten Testsystem reagierten drei Patienten der Gruppen B.

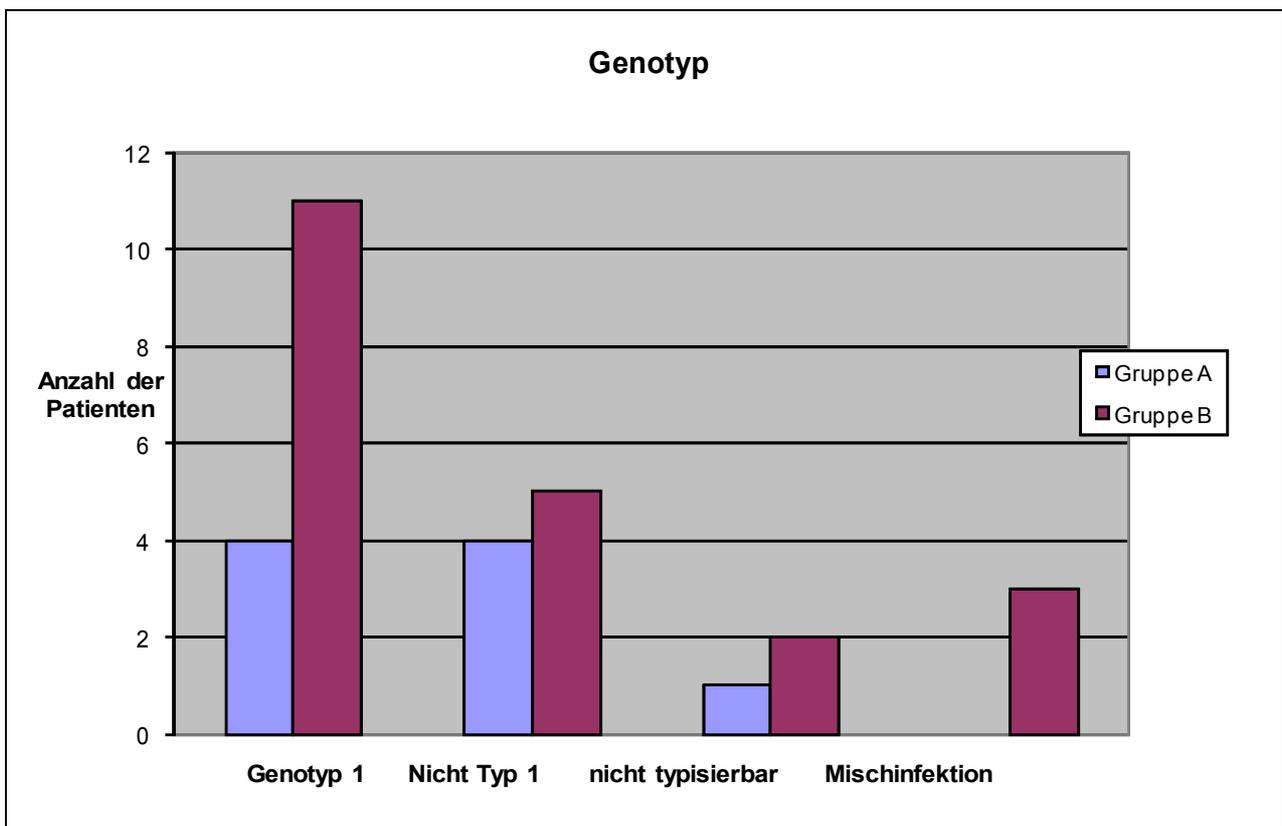


Abb. 9: Verteilung des Genotyps in Abhängigkeit vom Therapieansprechen, drei Patienten reagierten mit dem verwandten Testsystem unspezifisch und bei drei Patienten lag eine Mischinfektion mit mehreren HCV-Genotypen vor.

Von den 11 Patienten mit SVR erhielten sechs (55 %) eine Kombinationstherapie aus IFN α und Ribavirin, in Gruppe B fünf Patienten (21 %). Die übrigen Patienten erhielten eine Interferonmonotherapie. Es zeigte sich, dass von den 11 Patienten, die eine Kombinationstherapie erhielten, 55 % (6/11) ein langfristiges Ansprechen boten, während 45 % (5/11) kein langfristiges Ansprechen auf die Therapie zeigten. Bei den

Patienten, die eine Monotherapie erhielten, war die Verteilung folgendermaßen: Zu Gruppe A gehören 21 % (5/24), zur Gruppe B 79 % (19/24). Es zeigt sich also ein Unterschied bezüglich des Therapieansprechens abhängig vom Therapieregime, dieser Unterschied ist statistisch gesehen (Chi-Quadrat-Test) signifikant.

Die durchschnittliche Therapiedauer betrug bei Gruppe A 49 Wochen und bei Gruppe B 28 Wochen ($p < 0,0001$, Student t-Test). Die Therapiedauer ist also hoch signifikant.

Die wöchentliche Interferondosis lag bei Gruppe A bei 13 Mill. Einheiten, bei Gruppe B bei 16 Mill. Einheiten ($p = 0,12$, Student t-Test). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der wöchentlichen Interferondosis und dem Therapieerfolg.

3 Bestimmung der intrahepatischen TNF α und IFN γ mRNA

In allen Leberbiopsien konnte TNF α und IFN γ nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, wurden die semiquantitativ erfassten Werte für die Zytokine mit den ebenfalls semiquantitativ erfassten GAPDH-Werten in Relation gesetzt um eventuelle Unterschiede in der Effizienz der RNA-Extraktion und c-DNA-Synthese zwischen den einzelnen Proben auszugleichen, da solche Unterschiede sonst eine semiquantitative Auswertung verhindern würden.

3.1 Korrelation von TNF α mRNA-Werten mit dem Therapieansprechen

Die semiquantitativ festgestellten mRNA-Werte für TNF α lagen zwischen 0,37 und 11,43 (Ratio der Bandenintensität der Zielsequenz im Verhältnis zum Kompetitor), mit einem Mittelwert von 2,26. Die Verteilung bezüglich des Therapieansprechens war folgendermaßen: Gruppe A hat einen durchschnittlichen mRNA-Wert für TNF α von 1,13 (+/- 0,74), der Mittelwert der Gruppe B lag bei 2,78 (+/- 2,30). Somit zeigt sich zwischen den Gruppen A und B eine statistische Signifikanz ($p = 0,003$, Student t-Test) bezüglich der prätherapeutisch ermittelten mRNA-Menge des Zytokins und des Ansprechens auf eine Interferon-Therapie.

3.2 Korrelation von IFN γ mRNA-Werten mit dem Therapieansprechen

Die IFN γ -Werte lagen zwischen 0,04 und 1,35, mit einem Mittelwert von 0,35. Der Mittelwert der Patienten, die langfristig auf die Therapie ansprachen, lag durchschnittlich bei 0,24 (+/- 0,11), der Wert der Nicht-Ansprecher (Gruppe B) bei 0,40 (+/- 0,27). Somit ergibt sich auch hier eine statistische Signifikanz bezüglich der Höhe der Interferonwerte und des Therapieausgangs zwischen den Gruppen A und B. ($p = 0,015$, Student t-Test).

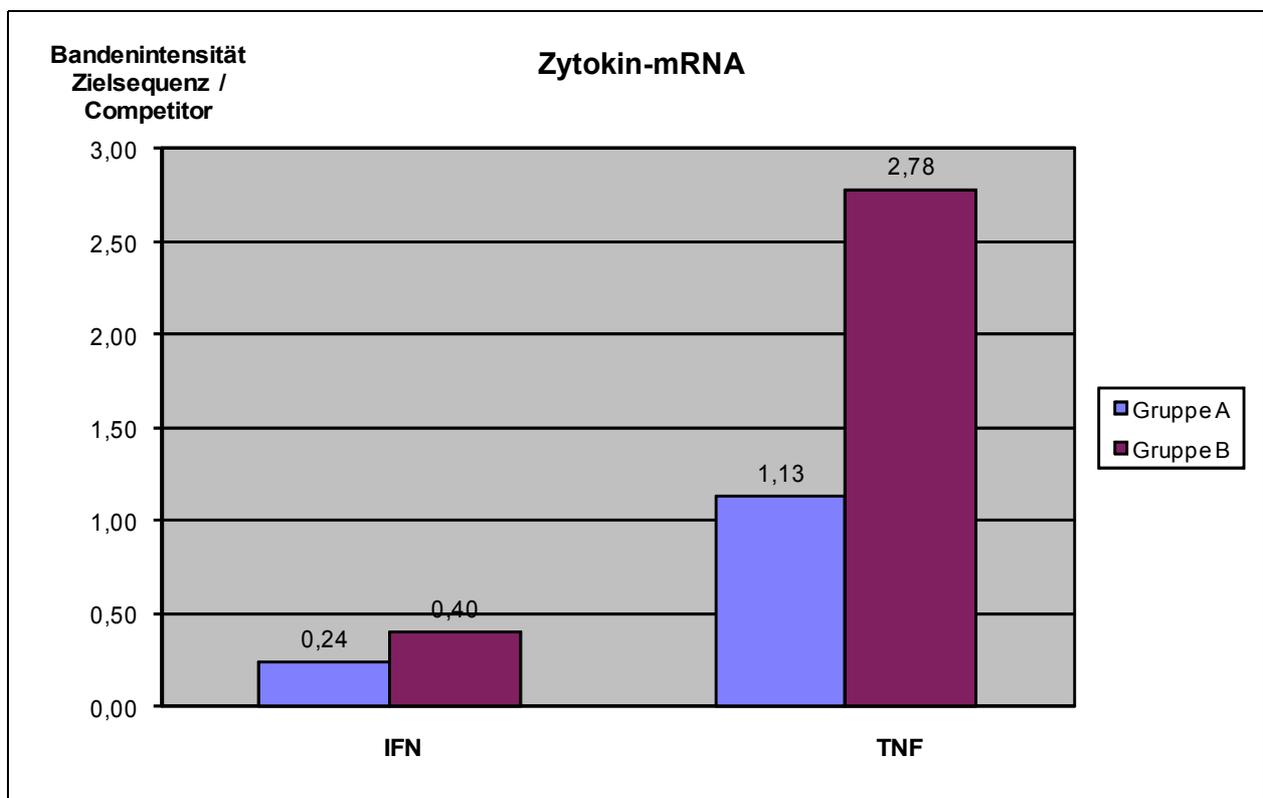


Abb. 10: Verteilung der Interferon γ und TNF α mRNA-Werte zwischen den beiden Gruppen

IV. Diskussion

Die Therapieresistenz ist – auch mit optimierten Therapiestrategien – weiterhin ein Hauptproblem der chronischen Hepatitis C Virus-Infektion, vor allem bei einer Infektion mit dem Genotyp 1. Obwohl die Ursachen für eine Therapieresistenz nicht im Detail geklärt sind, konnten verschiedene klinische Prädiktoren für die Effizienz einer antiviralen Therapie identifiziert werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass sowohl IFN γ als auch TNF α , die für eine Viruselimination in Hepatozyten wichtig sind (Guidotti et al., 1999), auch eine besondere Rolle im Rahmen der Immunantwort der Hepatitis C Virus-Infektion zukommt. So finden sich bei chronischer HCV-Infektion relativ hohe intrahepatische Werte für IFN γ mRNA (Dumoulin et al., 1997b) und auch die Expression von TNF α in der Leber und im Serum sind bei chronischer Hepatitis C im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht (Larrea et al., 1996; Zylberberg et al., 1999). Wir haben daher hier die intrahepatischen Mengen von IFN γ und TNF α mRNA semiquantitativ analysiert und neben bekannten wirts- und virusspezifische Faktoren mit dem klinischen Ansprechen einer antiviralen Therapie der chronischen HCV-Infektion korreliert.

Zwischen 8-30 % der Patienten, die eine Interferonmonotherapie erhalten, haben einen langfristigen virologischen Therapieerfolg, das heißt, dass sie auch 6 Monate nach Abschluss der Therapie einen negativen HCV-RNA-Nachweis im Blut haben (Camma et al., 1999; Lindsay, 1997). Bei Durchführung einer Kombinationstherapie bestehend aus Interferon und Ribavirin verbessert sich die Rate der Patienten, die einen langfristigen Therapieerfolg zeigen, auf durchschnittlich 31-65 % der behandelten Patienten (Barbaro et al., 2000; Mc Hutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Schalm et al., 1999). Bei den von uns untersuchten Patienten zeigten 31 % ein langfristiges Therapieansprechen. Im Einzelnen war bei uns die Verteilung folgendermaßen: 55 % der Patienten, die eine Kombinationstherapie erhielten, zeigten ein langfristiges Therapieansprechen, aber nur 21 % der Patienten, die mit Interferon α allein behandelt wurden. Die Ansprechraten der von uns untersuchten Patienten liegen also in den Bereichen, die oben genannte Autoren auch beobachtet haben.

1 Bedeutung von klinischen Faktoren auf das Therapieansprechen

Alter. Junges Alter (< 40, < 45 bzw. < 53 Jahren) gilt bei verschiedenen Autoren (Chemello et al., 1995; Martinot-Peignoux et al., 1998; Tomimatsu et al., 2006) als positiver Prädiktor für einen langfristigen Therapieerfolg, bei uns ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Alter und Ansprechen auf die Therapie, die Altersverteilung zwischen den Gruppen war bei uns annähernd gleich, das Durchschnittsalter lag bei unserer Untersuchung bei 42 Jahren, entspricht also in etwa dem prädiktiven Alterswert der oben genannten Autoren.

Gamma Glutamyl Transpeptidase. Ein normaler γ -GT-Wert vor Therapie gilt als ein positiver Prädiktor für einen langfristigen Therapieerfolg (Akuta et al., 2007; Berg et al., 2003; Chemello et al., 1995). Bei uns zeigten die Patienten, die initial auf die Therapie ansprachen, durchschnittlich normwertige γ -GT-Werte, während die Werte bei den Patienten, die nicht auf die Interferon-Therapie ansprachen, mäßig erhöht waren, es zeigt sich jedoch keine Signifikanz zwischen der Höhe der γ -GT-Werte und dem Ergebnis der Interferon-Therapie. Auch bei den übrigen untersuchten Leberwerten zeigte sich keine statistische Signifikanz bezüglich der Höhe und einem Ansprechen auf die Interferon-Therapie.

Prätherapeutische HCV-Viruslast. Niedrige HCV-RNA-Werte vor der Interferon-Therapie werden bei vielen Autoren (Backus et al., 2007; Berg et al., 2003; Manesis et al., 1997; Martinot-Peignoux et al., 1998; Shiratori et al., 1997; Tong et al., 1997; Yatsuhshi et al., 1999; Yu et al., 2007) als Prädiktoren für einen langfristigen Therapieerfolg beschrieben. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich bei uns eine statistische Signifikanz der prätherapeutischen Viruslast zwischen den Patienten, die einen langfristigen Therapieerfolg zeigten, und denen, bei denen es zu keinem dauerhaften Ansprechen auf die durchgeführte Therapie kam. Betrachtet man die einzelnen Patienten, so zeigt sich, dass 41 % der Patienten, die eine prätherapeutische Viruslast < 2 Mill. Kopien / ml haben, einen langfristigen Therapieerfolg zeigen, aber nur 11 % derjenigen, die eine prätherapeutische Viruslast >

2 Mill. Kopien / ml haben.

HCV Genotyp. Der Genotyp ist ein allgemein anerkannter Prädiktor für einen Therapieerfolg. Die Wahrscheinlichkeit für einen langfristigen Therapieerfolg auf eine IFN α -Monotherapie ist bei Patienten, die einen anderen Genotyp als 1 haben, signifikant höher (z. B. Martinot-Peignoux et al., 1998: „sustained response“ bei 5 % der Patienten mit Genotyp 1a, 4 % bei 1b, 32 % bei 2a und 27 % bei 3a; Zeuzem et al., 1995: „sustained response“ bei 0 % mit Genotyp 1a, 3 % bei Genotyp 1b, 20 % bei 2, 39 % bei 3a und 25 % bei 4). Die unterschiedliche Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens abhängig vom Genotyp, die bei der Interferonmonotherapie beobachtet wurde, gilt auch für die Kombinationstherapie. Laut Übersichtsarbeit von Pianko und McHutchison (2000) zeigten sich unterschiedliche Ansprechraten für Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind (17 bzw. 29 % nach 24 bzw. 48 Wochen Kombinationstherapie), und solchen, die mit den Typen 2 oder 3 infiziert sind (65 bzw. 67 % nach 24 bzw. 48 Wochen Kombinationstherapie). Da vor allem die Typ 1-Infizierten von einer längeren Therapiedauer profitieren, wurde dies auch in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten aufgenommen. Bei uns erreichten 27 % der Typ 1-Infizierten einen langfristigen Therapieerfolg, bei den Patienten, die mit einem anderen Genotyp infiziert waren, boten 44 % ein dauerhaftes Therapieansprechen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bei uns 55 % der Patienten, die auch 6 Monate nach Beendigung der Therapie noch virusfrei waren (SVR), eine Kombinationstherapie erhielten, liegen die bei uns festgestellten Zahlen in etwa in den vorher beschriebenen Bereichen. Allerdings zeigen bei uns die Unterschiede zwischen den mit Typ 1 und den Nicht-Typ 1-Infizierten keine statistische Signifikanz. Dies dürfte an den geringen Fallzahlen liegen, wir untersuchten 15 Typ 1-Infizierte, 9 der von uns untersuchten Patienten zeigten eine Infektion mit einem anderen Genotyp.

Kumulative Interferondosis. Bezüglich der wöchentlichen Interferondosis und dem Therapieansprechen zeigte sich, anders als bei Chemello et al. (1995), kein signifikanter Unterschied in unserer Untersuchung. Allerdings befanden sich die bei uns verwendeten Interferondosierungen (zwischen 13 und 16 Mill. Einheiten pro Woche), alle in dem von Chemello et al. für eine adäquate Therapie geforderten Bereich (11,25 bis 17,9 Mill. Ein-

heiten pro Woche). Da die Therapiedauer abhängig vom Ansprechen auf die IFN- α -Therapie war, ergibt sich hier zwischen den beiden Gruppen eine statistische Signifikanz.

2 Korrelation der intrahepatischen Zytokin mRNAs mit dem Therapieansprechen

Wir haben die intrahepatischen mRNA-Mengen der TH1-Zytokine IFN γ und TNF α bezüglich des Ansprechens auf eine Interferon α -Therapie untersucht. Wie bereits erwähnt, erhielt bei uns ein Teil der Patienten eine Monotherapie mit Interferon α , der andere Teil erhielt eine Kombinationstherapie mit Ribavirin und Interferon α . Hierbei stellt sich natürlich die Frage der Vergleichbarkeit der beiden Therapieformen. Es ist allgemein anerkannt, dass die Kombinationstherapie zu einem erhöhten Prozentsatz zu einem langfristigen Therapieerfolg führt. Weiterhin hat sich gezeigt, dass eine Kombinationstherapie bei Patienten, die ein Wiederauftreten der Virämie nach Beendigung einer Monotherapie zeigten, bei einem erneuten Therapieversuch in ca. 49 % zu einer langfristigen Viruselimination führt, im Gegensatz zu einer erneuten Monotherapie, die nur bei etwa 5 % der Behandelten zu einem langfristigen Therapieerfolg führt (Davis et al., 1998). Allerdings konnte bezüglich der Prädiktoren eines Therapieerfolgs beobachtet werden, dass die bekannten Faktoren, die das Ansprechen auf eine Interferon-Therapie beeinflussen, wie Viruslast, Fibrosegrad oder der Genotyp auch bei einer Kombinationstherapie die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs beeinflussen (Pianko und McHutchison, 2000; siehe auch Tab. 6 und 7 in der Einleitung).

In unserer Untersuchung ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den prätherapeutischen mRNA-Werten der Zytokine und dem Therapieausgang in Hinblick auf das Therapieverfahren. Obwohl die Therapieform also einen Einfluss auf das Therapieansprechen hat, scheinen die gleichen wirts- und virusspezifischen Faktoren ein Therapieansprechen zu beeinflussen, so dass eine Untersuchung der prätherapeutischen Zytokinprofile trotz der nachfolgenden unterschiedlichen Therapie-regime gerechtfertigt erscheint.

In unserer Untersuchung zeigte sich, dass die prätherapeutisch gemessene mRNA von

TNF α und IFN γ bei SVR signifikant niedriger sind als bei der anderen Patientengruppe. Fukuda et al. (1996) untersuchten ebenfalls prätherapeutisch die intrahepatische Zytokinexpression, hierbei zeigten sich signifikant niedrige Werte bei SR (biochemische Definition des Ansprechens) bezüglich der mRNA von IL-2, TNF β und IFN γ , kein Unterschied zeigte sich in dieser Studie bei IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 und TNF α bezüglich des Ansprechens auf eine Interferon-Therapie. Es zeigte sich eine Dominanz der TH1-Zytokine bei NR, und eine Dominanz der TH2-Zytokine bei Patienten, die auf eine IFN-Therapie ansprechen. Larrea et al. (1996) finden erhöhte prätherapeutische Werte für das TH1-Zytokin TNF α bei NR. Tomimatsu et al. (2006) finden eine prätherapeutisch dominierende TH2-Antwort bei SVR auf eine Kombinationstherapie. Sobue et al. (2001) finden eine Korrelation zwischen einer dominanten TH1-Antwort im peripheren Blut und in der Leber und der Krankheitsaktivität und dem Krankheitsfortschritt bei chronischer HCV-Infektion. Die Höhe der Typ 1-Zytokine IL-2, IFN γ und TNF β sowie IL-8 zeigen eine signifikante Korrelation mit der Hepatitis-Aktivität. Es stellt sich heraus, dass TH1-Zytokine bei Therapieversagern und TH2-Zytokine bei Therapieansprechern dominieren.

Unsere Ergebnisse zeigen hiermit übereinstimmend erhöhte prätherapeutische mRNA-Werte des TH1-Zytokins Interferon γ bei Patienten, die nicht dauerhaft auf eine Interferon-Therapie ansprechen (virologische Definition des Ansprechens). Anders als Fukuda et al. (1996), aber übereinstimmend mit Larrea et al. (1996) zeigen sich bei uns ebenfalls statistisch signifikant erhöhte Werte für TNF α bei Therapieversagern.

Prinzipiell passt dieses Ergebnis, trotz des Unterschieds bezüglich TNF α , zu dem von Fukuda et al. beobachteten Zytokinprofil. Ursächlich für diese zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Definition des Ansprechens sein. Während bei Fukuda et al. (1996) eine Normalisierung der Transaminasen als Therapieansprechen gewertet wurde, konnten wir durch den direkten Virusnachweis im Blut mittels PCR eine genauere, virologische Definition des Ansprechens vornehmen. Außerdem wurde diese Untersuchung an weniger Patienten (24, bei uns 35) und die Semiquantifizierung anhand von Verdünnungsreihen durchgeführt; hier zeigt sich im Gegensatz zu der bei uns durchgeführten kompetitiven PCR eine höhere Fehlerquelle durch mögliche Unterschiede in der Amplifikations-Effizienz.

Der antivirale Effekt von Interferon α wird über mehrere Mechanismen ausgeübt, zum einen besteht ein allgemein antiviraler Effekt, der unter anderem über 2',5'-Oligoadenylatsynthetase, Mx-Proteine und über doppelsträngige RNA-aktivierte Proteinkinase („double-stranded RNA-activated protein kinase“, PKR) vermittelt wird; zum anderen verstärkt IFN α die humorale und zytotoxische Immunantwort (Pawlotsky, 1998), insbesondere ist Interferon an der Stimulation der T-Zell-Proliferation während des Einsetzens der Immunantwort beteiligt (Thomas et al., 1999).

Die beiden hier untersuchten Zytokine gehören zu den Mediatoren der natürlichen Immunität, IFN γ wirkt antiviral und antiproliferativ, aktiviert Makrophagen, verstärkt NK und induziert die Expression von MHC-Klasse I und II-Molekülen. TNF α wird von Monozyten und Makrophagen gebildet und induziert die Bildung verschiedener Antigene, z. B. MHC Klasse 1 und 2, aktiviert Leukozyten und wirkt antiviral.

Interferon γ und TNF α gehören zu den TH1-Zytokinen, die die zelluläre Immunantwort verstärken. Bei Patienten mit einer selbst limitierenden HCV-Infektion überwiegt die T-Zell-Antwort im peripheren Blut, während sich nur eine schwache Antikörperproduktion zeigt (Cooper et al., 1999; Diepolder et al., 1996; Lechmann et al., 1996; Missale et al., 1996; Tsai et al., 1997). Eine frühe T-Zell-Aktivierung scheint also eine entscheidende Rolle für den Ausgang einer akuten Hepatitis C-Infektion zu spielen.

Bei Patienten mit einem langfristigen Ansprechen auf eine IFN α -Therapie liegt unter der Therapie eine stärkere und länger andauernde Verstärkung der Virus-spezifischen T-Zellreaktion vor, welche gleichzeitig mit einer verstärkten IFN γ -Produktion korreliert, während Nicht-Ansprecher eine schwache oder fehlende Lymphoproliferation mit einer stärkeren Produktion von IL-10 (TH 2) zeigen (Cramp et al., 2000).

Hierzu passend beobachteten Nelson et al. (1998), dass das Vorhandensein einer nachweisbaren CTL-Aktivität in leberinfiltrierenden Lymphozyten mit einem langfristigen Therapieansprechen auf eine nachfolgende IFN-Therapie assoziiert ist. Die CTL-Antwort ist wichtig für die Beseitigung infizierter Hepatozyten, eine Verstärkung des TH-1-Zytokinprofils verstärkt die CTL-Aktivität.

Die TH1-Zytokine herrschen bei der selbstlimitierenden Form der Erkrankung vor (Ferrari et al., 1998), verstärken die für die Überwindung der Infektion günstige T-Zellantwort und beeinflussen unter einer Interferon-Therapie den Therapieausgang günstig.

Trotzdem sind gerade diese Zytokine prätherapeutisch intrahepatisch bei den Patienten, die nicht oder nur kurzfristig auf die Therapie ansprechen, erhöht. Es könnte also bei den Virusstämmen, die eine Resistenz gegenüber der Interferon-Therapie demonstrieren, ein vermindertes Ansprechen gegenüber den Effekten von IFN γ und TNF α vorliegen. Auch Thomas et al. (1999) vermuten, dass ein fehlendes Ansprechen auf eine Interferon-Therapie durch die Selektion IFN-resistenter Viren unter dem Selektionsdruck endogenen Interferons bedingt sein könnte.

Bereits Gale und Katze (1998) und Taylor et al. (1999) haben eine Hemmung der Interferon-induzierten Protein-Kinase durch bestimmte Virusproteine beobachtet. Die daraus folgende Interferonresistenz als mögliche Ursache für ein Therapieversagen könnte auch bezüglich des endogenen Interferons gelten, die prätherapeutisch erhöhten Werte für Interferon γ könnten also bereits ein Anzeichen für eine bestehende Interferonresistenz gegen endogenes und später auch therapeutisch gegebenes Interferon sein. Zu dieser Hypothese würde auch die Überlegung von Davis et al. (1998) passen, der ein fehlendes Ansprechen auf eine Interferon-Therapie durch Selektion IFN-resistenter Virusstämme unter dem Selektionsdruck endogenen Interferons erklärt.

Es zeigt sich, dass die Expression von HCV-Proteinen zu einer Hemmung der durch IFN α induzierten Signalübertragung über den Jak-STAT-Weg führt sowie zu einer Störung der Effektorfunktion des IFN (de Lucas et al., 2005; Duong et al., 2005; Heim et al., 1999). Man könnte mutmaßen, dass eine solche Beeinflussung nicht nur für IFN α , sondern auch für Interferon γ gelten kann. Viele Zytokine, unter anderem IFN α , IFN γ und TNF α induzieren die Expression von SOCS in Hepatozyten (Gao et al., 2004). Hong et al. (2001) konnten zeigen, dass die Injektion von TNF α die IFN α -Signalwege stört und die Bildung von SOCS 3 und SHP2 in der Leber induziert und möglicherweise so eine Therapieresistenz begünstigt.

Ein vermindertes Ansprechen gegenüber dem Effekt der Zytokine konnte auch durch Interaktion mit Zytokinrezeptoren beobachtet werden. So zeigt die Übersichtsarbeit von Lai und Ware (2000), dass das Core-Protein des HCV an verschiedene TNF-Rezeptoren bindet. Je nach Zelltyp konnte in Zellkulturen, aber auch zum Teil an Tiermodellen eine verstärkte, unveränderte oder auch verminderte Sensibilität bezüglich TNF gezeigt

werden. Auch eine Interaktion mit Zytokinrezeptoren könnte also eine weitere Ursache sein, warum das Virus trotz günstigen TH1-Zytokinprofils in der Lage ist zu persistieren.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den bekannten klinischen Prädiktoren und den beiden hier untersuchten Zytokinen aufzudecken, wäre die Durchführung einer multivariaten Analyse notwendig. Bei einem Vergleich durch wiederholte univariate Analyseverfahren (Student t-Test und Chi-Quadrat-Test) erhöht sich der Typ I-Fehler, das heißt es wird irrtümlicherweise die Nullhypothese verworfen. Zur adäquaten Durchführung eines multivariaten Analyseverfahrens, z.B. einer Regressionsanalyse benötigt man jedoch eine ausreichend große Patientenzahl. Conjeeveram et al. (1995) empfehlen hier z.B. als Faustregel bei der Analyse von Faktoren, die den Ausgang einer IFN-Therapie voraussagen, Untersuchungen mit wenigstens 30 Therapieansprechern, da sonst der Typ II-Fehler zu dominant wird. Da in dieser Arbeit – aufgrund der zum Untersuchungszeitpunkt aufwändigen Nachweismethode für die mRNA von Zytokinen – nur 35 Patienten untersucht wurden, wurde hier bewusst kein multivariates Analyseverfahren verwandt.

Ziel dieser Arbeit war unter anderem die Identifikation möglicher Prädiktoren für den Therapieverlauf einer IFN α -Therapie bei chronischer HCV-Infektion. Da es sich um eine explorative Studie handelt, mit den oben genannten Einschränkungen aufgrund der geringen Untersuchungszahlen, ist trotz der Hinweise, dass das intrahepatische Zytokinprofil Einfluss auf den Therapieausgang hat, eine Anwendung als Prädiktor für den Therapieverlauf so noch nicht möglich. Prädiktoren für den klinischen Gebrauch sollten einfach und genau zu bestimmen und auch außerhalb von Studiensituationen anwendbar sein. Weiterhin wäre es hilfreich, bei den hier als kontinuierliche Variablen untersuchten Faktoren Grenzwerte zu definieren, ab wann ein positiver bzw. negativer Therapieausgang prognostiziert werden kann, wie dies z.B. bei der Viruslast erfolgt ist. Hierfür ist eine Arbeit leider nicht ausreichend. Die hier gefundenen Werte sind rein deskriptiver Natur, insbesondere auch aufgrund der geringen hier untersuchten Fallzahlen. Gerade aber im Hinblick auf die mittlerweile erzielten Fortschritte im Bereich der PCR ist die Untersuchung größerer Kollektive jetzt möglich, so dass weitere, confirmatorische Untersuchungen auf diesem Gebiet abzuwarten bleiben.

3 Mögliche Limitationen der Arbeit

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1997 bis April 1998 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Methodik der kompetitiven Polymerasekettenreaktion noch in der Anfangsphase. Seitdem wurden gravierende Fortschritte gemacht. Der Zeit- und Organisationsaufwand wurde z.B. mit Einführung der „real-time“-PCR Anfang 2000 deutlich reduziert, so dass jetzt eine schnellere, einfachere und umfangreichere Untersuchung von Proben möglich ist. Trotzdem haben sich die Grundlagen der Methodik natürlich nicht verändert, sondern sind weiterentwickelt und verfeinert worden. Obwohl die Arbeit vor über zehn Jahren begonnen wurde, zeigt sich bei einem Vergleich mit neuerer Literatur, dass sich zwar Verbesserungen in den Therapieverfahren ergeben haben und auch das Wissen um mögliche Ursachen der Persistenz des HCV und einer Therapieresistenz auf IFN α basierender Therapieverfahren erweitert hat, für diese Phänomene konnten trotzdem noch keine abschließenden Erklärungen gefunden werden. Die bei uns beobachteten Ergebnisse lassen sich auch mit neueren Erkenntnissen in Verbindung bringen, sind also nicht überholt oder veraltet.

Therapieansprechen. Die aktuelle Standardtherapie der chronischen Hepatitis C-Infektion besteht aus einer Kombinationstherapie von pegyliertem Interferon α und Ribavirin. Diese Therapie haben unsere Patienten nicht erhalten, da diese zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit noch nicht zur Verfügung stand. Unter dieser Therapie ist die Ansprechrate deutlich verbessert worden. Insbesondere ist es hierunter möglich, einem Teil der Patienten, die auf eine Therapie mit konventionellem Interferon nicht angesprochen haben, noch zu einem dauerhaften Therapieansprechen zu verhelfen.

V. Zusammenfassung

Hepatitis C ist eine weltweit vorkommende Virusinfektion mit einer hohen Chronifizierungsrate von etwa 60 %. Da mit modernen Therapiestrategien nur bei etwa der Hälfte der behandelten Personen eine Viruselimination beobachtet werden kann, stellen sich die Fragen, welche Faktoren zu einer Therapieresistenz führen und ob es Prädiktoren gibt, anhand derer man den Therapieverlauf vorhersehen kann.

Ziel dieser Arbeit war die Korrelation der prätherapeutischen intrahepatischen mRNA-Werte von IFN γ und TNF α mit dem Therapieverlauf einer IFN α -Therapie bei chronischer HCV-Infektion.

Bei 35 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion wurden vor einer geplanten Interferon-Therapie die intrahepatische Zytokin-mRNA der beiden Typ I- Zytokine IFN γ und TNF α mittels Polymerasekettenreaktion semiquantitativ untersucht und mit dem nachfolgenden Therapieverlauf verglichen. Außerdem wurden bereits durch andere Studien bekannte klinische Faktoren (Prädiktoren) mit dem Therapieansprechen korreliert.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied verschiedener Virusgenotypen auf das Therapieansprechen beobachtet werden, ebenso zeigte sich kein Unterschied zwischen wöchentlicher Interferondosis, Geschlecht, Alter der Patienten oder prätherapeutischen Leberwerten. Einzig bei der prätherapeutischen Viruslast und dem Therapieregime zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die auf eine Interferon-Therapie ansprachen, und solchen, die nicht ansprachen.

Bei der Untersuchung der intrahepatischen Zytokin-mRNA von IFN γ und TNF α zeigte sich, dass Patienten, die langfristig auf eine Therapie mit Interferon α ansprachen, signifikant niedrigere Werte der mRNA dieser beiden Zytokine bieten, als Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprachen.

In dieser Untersuchung waren Interferondosis, Therapiedauer und Alter der Patienten

homogener als bei den vorhergegangenen Studien, die diese Faktoren als Prädiktoren für ein Therapieansprechen identifizierten; die fehlende Signifikanz bezüglich der prätherapeutischen Leberwerte sowie des Genotyps dürfte in der in dieser Untersuchung niedrigeren Patientenzahl liegen.

Eine Verwendung des prätherapeutischen Zytokinprofils als Prädiktor für das Therapieansprechen ist momentan nicht möglich, hierzu müssten weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv erfolgen.

Ein Nicht-Ansprechen auf eine Interferon-Therapie korreliert mit einer prätherapeutischen Erhöhung eines ansonsten für die Infektionsüberwindung günstigen Zytokinprofils. Das könnte heißen, dass hier Virusstämme vorliegen oder selektioniert wurden, die trotz ungünstiger Überlebensbedingungen in der Lage sind zu persistieren. Es gibt verschiedene Ansätze, die diese Resistenz gegenüber bestimmten Zytokinen zu erklären versuchen, sichere Erklärungen für dieses Phänomen gibt es derzeit jedoch nicht. Zum genaueren Verständnis der Therapieresistenz müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Ein weiteres und besseres Verstehen der Wechselwirkungen zwischen der Immunreaktion des Wirtes, dem Virus und der Wirkung des Interferons könnte zur Optimierung der vorhandenen oder zur Entdeckung neuer und besserer therapeutischer Strategien im Kampf gegen die chronische HCV-Infektion führen.

VI. Publikation

Die Daten dieser Arbeit waren unter anderem Grundlage für folgende Publikation:

Dumoulin FL, Wennrich U, Nischalke HD, Leifeld L, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Intrahepatic mRNA Levels of Interferon γ and Tumor Necrosis Factor α and Response to Antiviral Treatment of Chronic Hepatitis C. *J Human Virol* 2001; 4: 195-199

VI. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. In: Wonsiewicz MJ, Hrsg.. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1991: 225-243

Abbate I, Romano M, Longo R, Cappiello G, Lo Iacono O, Di Marco V, Paparella C, Spano A, Capobianchi MR. Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients. J Med Virol 2003; 70: 581-587

Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. J Hepatol 2007; 46: 403-410

Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino Acid Substitutions in the Hepatitis C Virus Core region are the Important Predictor of Hepatocarcinogenesis. Hepatology 2007; 46: 1357-1364

Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. J Hepatol 1999; 31: 17-24

Alter HJ. To C or not to C: These are the questions. Blood 1995; 85: 1681-1695

American Gastroenterological Association, Dienstag JI, MC Hutchison JG. American Gastroenterological Association Technical review on the Management of Hepatitis C. Gastroenterology 2006; 130: 231-264

Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. Hepatology 1992; 15: 572-577

Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Mole LA. Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46: 37-47

Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, Giancaspro G, Pellicelli A, Grisorio B, Barbarini G. Evaluation of long-term efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin in combination in naive patients with chronic hepatitis C: an Italian multicenter experience. Ribavirin-Interferon in Chronic Hepatitis Italian Group Investigators. *J Hepatol* 2000; 33: 448-455

Bedossa P, Poynard T. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-293

Benvegnù L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004; 53: 744-749

Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, Wiedenmann B, Hopf U, Zeuzem S. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003; 37: 600-609

Booth JC, Kumar U, Webster D, Monjardino J, Thomas HC. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 1998; 27: 223-227

Bouaboula M, Legoux P, Pességué B, Delpech B, Dumont X, Piechaczyk M, Casellas P, Shire D. Standardization of mRNA Titration Using a Polymerase Chain Reaction Method Involving Co-amplification with a Multispecific Internal Control. *J Biol Chem* 1992; 267: 21830-21838

Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L. Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon nonresponsive chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 630-634

Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology* 1997; 25: 754-758

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Molec Endocrin* 2000; 25: 169-193

Buti M, San Miguel R, Brosa M, Cabases JM, Medina M, Angel Casado M, Fosbrook L, Esteban R. Estimating the impact of hepatitis C virus therapy on future liver-related morbidity, mortality and costs related to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005; 42: 639-645

Camma C, Giunta M, Pinzello G, Morabito A, Verderio P, Pagliaro L. Chronic hepatitis C and interferon alpha: conventional and cumulative meta-analyses of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 581-595

Camma C, Giunta M, Adreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol* 2001; 34: 593-602

Carreno V, Quiroga JA. New and forthcoming therapies for viral hepatitis. *J Hepatol* 1996; 24: 74-76

Chambers TJ, Fan X, Droll DA, Hembrador E, Slater T, Nickells MW, Dustin LB, DiBisceglie AM. Quasispecies Heterogeneity within the E1/E2 Region as a Pretreatment Variable during Pegylated Interferon Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 2005; 79: 3071-3083

Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Koiki H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotyp 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 745-749

Chemello L, Cavalletto L, Noventa F, Bonetti P, Casarin C, Bernardinello E, Pontisso P, Donada C, Casarin P, Belussi F. Predictors of sustained response, relapse and no response in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *J Viral Hepat* 1995; 2: 91-96

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159

Choo Q, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362

Choo Q, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2451-2455

Colucci G, Gutekunst K. Development of a quantitative PCR assay for monitoring HCV viraemia levels in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 1997; 4: 75-78

Conjeevaram HS, Everhart JE, Hoofnagle JH. Predictors of a sustained beneficial response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 1326-1329

Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449

Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C Virus-specific T-Cell Reactivity During Interferon and Ribavirin Treatment in Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118: 346-355

Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1493-1499

Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002; 76: 12584-12595

De Carli G, Puro V, Ippolito G. Risk of hepatitis C virus transmission following percutaneous exposure in healthcare workers. *Infection* 2003; 31: 22-27

De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953-959

Deltenre P, Herion J, Canva, V, Dharancy S, Texier F, Louvet A, De Maeght S, Paris JC, Mathurin P. Evaluation of amantadine in chronic hepatitis C: a meta-analysis *J Hepatol* 2004; 41: 462-473

De Lucas S, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis* 2005; 191: 93-99

Depraetere S, Van Kerschaever E, Van Vlierberghe H, Elewaut A, Brouwer JT, Niesters HGM, Schalm SW, Maertens G, Leroux-Roels G. Long term response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients is associated with a significant reduction in anti-E1 envelope antibody titers. *J Med Virology* 2000; 60: 126-132

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520

Di Biscegli AM, Hoofnagle JH. Optimal Therapy of Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 121-127

Diepolder HM, Zchoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Gerlach T, Pape GR. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. *J Mol Med* 1996; 74: 583-588

Diepolder HM. Prophylaxe und Therapie der Virushepatitiden. *Internist* 2004; 45: 197-210

Dumoulin FL, Reichel C, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitation of intrahepatic MDR3 mRNA levels by reverse transcription/competitive polymerase chain reaction. *J Hepatol* 1997; 26: 852-856

Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997; 175: 681-685

Dumoulin FL, Spengler U, Sauerbruch T. Hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1063-1065

Dumoulin FL, Leifeld L, Sauerbruch T, Spengler U. Autoimmunity induced by interferon-alpha for chronic viral hepatitis. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 242-254

Dumoulin FL. Semiquantitative Analyse intrahepatischer mRNA Spezies bei chronisch Entzündlichen Leberkrankungen. Habilitationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2000

Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterol* 2004; 126: 263-277

Eddleston ALWF. Hepatitis C infection and autoimmunity. *J Hepatol* 1996; 24: 55-60

El-Gogo S, Staib C, Lasarte JJ, Sutter G, Adler H. Protective vaccination with hepatitis C virus NS3 but not core antigen in a novel mouse challenge model. *J Gene Med* 2008; 10: 177-186

Elmowalid GA, Qiao M, Jeong SH, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, Hu Z, Murthy K, Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8427-8432

El-Serag HB, Hampel H, Yeh C, Rabeneck L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology* 2002; 36: 1439-1445

El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res* 2007; 37: 88-94

Encke J, Radunz W, Eisenbach C, Geib J, Gehrke S, Pfaff E, Stremmel W. Development of a heterologous, multigenotype vaccine against hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 396-406

European Paediatric Hepatitis C Virus Network. A significant sex-but not elective cesarean section-effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2005; 192: 1872-1879

Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzeri A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344

Farci P, Strazzeri R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3081-3086

Fattovich G, Giustina G, Degos F, Diodati G, Tremolada F, Nevens F, Almasio P, Solinas A, Brouwer JT, Thomas H, Realdi G, Corrocher R, Schalm SW. Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J Hepatol* 1997; 27: 201-205

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 967-972

Feray C, Caccamo L, Alexander GJ, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T, Loinaz C, Gigou M, Burra P, Barkholt L, Esteban R, Bizollon T, Lerut J, Minello-Franza A, Bernard PH, Nachbaur K, Botta-Fridlund D, Bismuth H, Schalm SW, Samuel D. European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP) Group. *Gastroenterology* 1999; 117: 619-625

Ferrari C, Penna A, Bertolotti A, Cavalli A, Missale G, Lamonaca V, Boni C, Valli A, Bertoni R, Urbani S, Scognamiglio P, Fiaccadori F. Antiviral cell-mediated immune response during hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154: 330-336

Ferrari C, Urbani S, Penna A, Cavalli A, Valli A, Lamonaca V, Bertoni R, Boni C, Barbieri K, Uggeri J, Fiaccadori F. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31: 31-38

Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, Reddy KR. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005; 43: 425-433

Firbas C, Jilma B, Tauber E, Buerger V, Jelovcan S, Lingnau K, Buschle M, Frisch J, Klade CS. Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine* 2006; 24: 4343-4353

Fischer HP, Willsch E, Bierhoff E, Pfeifer U. Histopathologic findings in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 24: 35-42

Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, Martin P, Silvestre N, Balloul JM, Barry R, Inchauspé G. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 2007; 25: 7339-7353

Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2986-2991

Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 1991; 2: 223

Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol* 2001; 34: 809-816

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potentials. *Bio Technic* 1999; 26: 112-125

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus Ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982

Fukuda R, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C, Miyake T, Niigaki MJ, Tokuda A, Satho S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16: 390-399

Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230: 217-227

Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945

Gao B, Hong F, Radaeva S. Host Factors and Failure of Interferon- α Treatment in Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2004; 39: 880-890

Gao B. Cytokines, STATs and Liver Disease. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 92-100

Gerber MA, Krawczynski K, Alter MJ, Sampliner RE, Margolis HS. Histopathology of community acquired chronic hepatitis C. The Sentinel Counties Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Study Team. *Mod Pathol* 1992; 5: 483-486

Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagel JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterol* 2003; 124: 97-104

Gordon SC, Patel AH, Kulesza GW, Barnes RE, Silverman AL. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1849-1851

Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science* 1999; 284: 825-829

Hasan F, Al-Khaldi J, Asker H, Al-Ajmi M, Owayed S, Varghese R. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin with or without amantadine for the treatment of non-responders to standard interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 2004; 9: 499-503

He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156: 636-640

He XS, Ji X, Hale MB, Cheung R, Ahmed A, Guo Y, Nolan GP, Pfeffer LM, Wright TL, Risch N, Tibshirani R, Greenberg HB. Global Transcriptional Response to Interferon Is a Determinant of HCV Treatment Outcome and Is Modified by Race. *Hepatology* 2006; 44: 352-359

Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the Jak-STAT Pathway. *J Virol* 1999; 73: 8469-8475

Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: Epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26: 521-526

Hong F, Nguyen VA, Gao B. Tumor necrosis factor α attenuates interferon- α signaling in the liver: involvement of SOCS3 and SHP2 and implication in the resistance to interferon therapy. *FASEB J* 2001; 15: 1595-1607

Hu KQ, Kyulo NL, Esrailian E, Thompson K, Chase R, Hillebrand DJ, Runyon BA. Overweight and obesity, hepatic steatosis, and progression of chronic hepatitis C: a retrospective study on a large cohort of patients in the United States. *J Hepatol* 2004; 40: 147-154

Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y, Minami M, Murakami Y, Kashima K. Serum Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Effects of Interferon Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1332-1340

Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, Fowler N, Blackard JT, Lin W, Choe WH, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005; 41: 660-667

Kao JH, Liu CJ, Chen PJ, Chen W, Lai MY, Chen DS. Low incidence of hepatitis C virus transmission between spouses: a prospective study. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 391-395

Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotoho K. Humoral immune response to variable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67: 3923-3930

Kawamura H, Govindarajan S, Aswad F, Machida K, Lai MM, Sung VM, Dennert G. HCV core expression in hepatocytes protects against autoimmune liver injury and promotes liver regeneration in mice. *Hepatology* 2006; 44: 936-944

Kim WR. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microb und Infect* 2002; 4: 1219-1225

Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435

Kuhnl P, Roggendorf M, Stangel W, Seidl S, Laufs R, Sibrowski W, Bornhovd K, Polywka S, Kalmar G, Deinhardt F. Hepatitis C antibodies in non-A, non-B hepatitis patients and members of HIV risk groups. *Beitr Infusionsther* 1990; 26: 30-32

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redecker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1998; 244: 362-364

Lachmund A, Sachse GE. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In: Gassen, Sachse, Schulte, Hrsg.. PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1994: 1-13

Lai MMC, Ware CF. Hepatitis C Virus Core Protein: Possible Roles in Viral Pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242: 117-134

Larrea E, Garcia N, Qian C, Civeira MP, Prieto J. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 210-217

Lau JYN, Krawczynski K, Negro F, González-Peralta RP. In situ detection of hepatitis C virus - a critical appraisal. *J Hepatol* 1996; 24: 43-51

Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2004; 127: 924-936

Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 1996; 24: 790-795

Lee SH, Kim YK, Kim CS, Seol SK, Kim J, Cho S, Song SK, Bartenschlager R, Jang SK. E2 of Hepatitis C Virus Inhibits Apoptosis. *J Immunol* 2005; 175: 8226-8235

Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 1993; 104: 595-603

Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997

Lim JK, Wooten D, Siegel R, Cheung RC. Amantadine in treatment of chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005; 12: 445-455

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-938

Lindsay KL. Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997; 26: 71-77

Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-1538

Males S, Gad RR, Esmat G, Abobakr H, Anwar M, Rekacewicz C, El Hoseiny M, Zalata K, Abdel-Hamid M, Bedossa P, Pol S, Mohamed MK, Fontanet A. Serum alpha-fetoprotein level predicts treatment outcome in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2007; 12: 797-803

Manesis EK, Papaioannou C, Gioustozi A, Kafiri G, Koskinas J, Hadziyannis SJ. Biochemical and virological outcome of patients with chronic hepatitis C treated with interferon alfa-2b for 6 or 12 month: A 4-year follow-up of 211 patients. *Hepatology* 1997; 26: 734-739

Martinot-Peignoux M, Boyer N, Poteau M, Castelnau C, Giuily N, Duchatelle V, Aupérin A, Degott C, Benhamou JP, Erlinger S, Marcellin P. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatology* 1998; 29: 214-223

Mathai J, Shimoda K, Banner BF, Mori M, Bonkovsky HL, Barnard GF. IFN-alpha receptor mRNA expression in a United States sample with predominantly genotype 1a/l chronic hepatitis C liver biopsies correlates with response to IFN therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 19: 1011-1018

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-1492

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 704-714

Mitsuhashi M. Technical Report: Part 2. Basic Requirements for Designing Optimal PCR Primers. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 285-293

Mondelli MU, Cerino A, Lisa A, Brambilla S, Segagni L, Cividini A, Bissolati M, Missale G, Bellati G, Meola A, Bruniercole B, Nicosia A, Galfre G, Silini E. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology* 1999; 30: 537-545

Morita K, Tanaka K, Saito S, Kitamura T, Kiba T, Fujii T, Numata K, Sekihara H. Expression of interferon receptor genes in the liver as a predictor of interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 1999; 58: 359-365

Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1067

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedli MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357

Nelson DR, Marousis CG, Ohno T, Davis GL, Lau JYN. Intrahepatic Hepatitis C virus-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Activity and Response to Interferon Alfa Therapy in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 225-230

Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hurter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W, Haussinger D. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large prospective cohort study. *Hepatology* 1998; 28: 1687-1695

Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, Shiomi S, Seki S, Kobayashi K, Otani S. Randomised trial of effect of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346: 1051-1055

Noonan KE, Roninson IB. mRNA phenotyping by enzymatic amplification of randomly primed cDNA. *Nucl Aci Res* 1988; 16: 10366

Offergeld R, Ritter S, Faensen D, Hamouda O. Infection epidemiological data among blood donors in Germany 2003-2004. Report of the Robert Koch Institute in accordance with Article 22 of the Transfusion Act. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005; 48: 1273-1287

Opdenakker G, Cabeza-Arvelaiz Y, Van Damme J. Interaction of interferon with other cytokines. *Experientia* 1989; 45: 513-520

Pagliari L, Peri V, Linea C, Camma C, Giunta M, Magrin S. Natural history of chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 28-44

Patton HM, Patel K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Vallée M, Heaton S, Conrad A, Pockros PJ, McHutchison JG. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004; 40: 484-490

Pavlovic J, Schroeder A, Blank A, Pitossi F, Staeheli P. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba Found Symp* 1993; 176: 233-243

Pawlotsky JM. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *J Viral Hepat* 1998; 5: 3-8

Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Cosset BFL, Patel AH, Meisel H, Baumer J, Rispeter K, Blum HE, Roggendorf M, Baumert TF. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6025-6030

Pianko S, McHutchison JG. Treatment of hepatitis C with interferon and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 581-586

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941

Platzer C, Ode-Hakim S, Reinke P, Döcke WD, Ewert R, Volk HD. Quantitative PCR analysis of cytokine transcription patterns in peripheral mononuclear cells after anti-CD3 rejection therapy using two novel multispecific competitor fragments. *Transplantation* 1994; 58: 264-268

Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75: 6095-6106

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352: 1426-1432

Poynard T, Moussali J, Ratziu V, Regimbeau C, Opolon P. Effects of interferontherapy in „non responder“ patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31: 178-183

Prince AM, Brotman B, Lee DH, Ren L, Moore BS, Scheffel JW. Significance of the anti-E2 response in self-limited and chronic hepatitis C virus infections in chimpanzees and in humans. *J Infect Dis* 1999; 180: 987-991

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. *Am J Infect Control* 1995; 23: 273-277

Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 226: 176-182

Realdon S, Gerotto M, Dal PF, Marin O, Granato A, Basso G, Muraca M, Alberti A. Proapoptotic effect of hepatitis C virus CORE protein in transiently transfected cells is enhanced by nuclear localization and is dependent on PKR activation. *J Hepatol* 2004; 40: 77-85

Reichard O, Glaumann H, Frydén A, Norkrans G, Wejstal R, Weiland O. Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to alpha-interferon. *J Hepatol* 1999; 30: 783-787

Roccasecca RM, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarelli E, Acali S, Pezzanera M, Ercole BB, McKeating J, Yagnik A, Lahm A, Tramontano A, Cortese R, Nicosia A. Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Region 1 and 2. *J Virol* 2003; 77: 1856-1867

Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997; 229: 68-76

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491

Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 778-809

Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999; 30: 1004-1013

Sarrazin C, Berg T, Weich V, Mueller T, Frey UH, Zeuzem S, Gerken G, Roggendorf M, Siffert W. GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa/ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection. *J Hepatol* 2005; 43: 388-393

Schalm SW, Weiland O, Hansen BE, Milella M, Lai MY, Hollander A, Michielsen PP, Bellobuono A, Chemello L, Pastore G, Chen DS, Brouwer JT, Eurohep Study Group For Viral Hepatitis. Interferon-ribavirin for chronic hepatitis C with and without cirrhosis: analysis of individual patient data of six controlled trials. *Gastroenterology* 1999; 117: 408-413

Seef LB. Natural History of Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S36-S46

Sergi C, Jundt K, Seipp S, Goeser T, Theilmann L, Otto G, Otto HF, Hofmann WJ. The distribution of HBV, HCV and HGV among livers with fulminant hepatic failure of different aetiology. *J Hepatol* 1998; 29: 861-871

Shiratory Y, Kato N, Yokosuka O, Hashimoto E, Hayashi N, Nakamura A, Asada M, Kuroda H, Ohkubo H, Arakawa Y, Iwama A, Omata M. Quantitative assays for hepatitis C virus in serum as predictors of the long-term response to interferon. *J Hepatol* 1997; 27: 437-444

Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 1992; 359: 557-558

Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, McOmish F, Dow BC, Follett EAC, Yap PL, Marsden H. Mapping of Serotype-Specific, Immunodominant Epitopes in the NS-4 Region of Hepatitis C Virus (HCV): Use of Type-Specific Peptides To Serologically Differentiate Infections with HCV Types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-1503

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen D, Choo Q, Colombo M, Cuypers HTM, Date T, Dusheiko GM, Esteban JI, Fay O, Hadzyannis SJ, Han J, Hatzakis A, Holmes EC, Hotta H, Houghton M, Irvine B, Kohara M, Kolberg JA, Kuo G, Lau JYN, Lelie PN, Maertens G, McOmish F, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice CM, Roggendorf M, Schalm SW, Shikata T, Shimotohno K, Stuyver L, Trépo C, Weiner A, Yap PL, Urdea MS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy G, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thie HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposal for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973

Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, Kakumu S. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2001; 36: 544-551

Spengler U, Lechmann M, Irrgang B, Dumoulin FL, Sauerbruch T. Immune response in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1996; 24: 20-25

Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-Specific T Cells Without Differential Hierarchy Demonstrated Ex Vivo in Persistent HCV Infection. *Hepatology* 2003; 38: 1437-1448

Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582

Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, Munekata E, Muchmore EE, Peterson DA, Mishiro S. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195: 297-301

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9292-9296

Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC. Inhibition of the Interferon-Inducible Protein Kinase PKR by HCV E2 Protein. *Science* 1999; 285: 107-109

Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001; 75: 1265-1273

Templeton NS. The Polymerase Chain Reaction. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 58-72

Theilmann L, Solbach C, Toex U, Müller HM, Pfaff E, Otto G, Goeser T. Role of hepatitis C virus infection in German patients with fulminant and subacute hepatic failure. *Europ J Clin Invest* 1992; 22: 569-571

Thomas HC, Török ME, Forton DM, Taylor-Robinson SD. Possible mechanism of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31: 152-159

Tomimatsu M, Aizawa Y, Chuganji Y, Ishizuka H, Fujita Y, Aizawa R, Abe H, Matsuda T, Ito Y, Nakanishi H, Ushiyama H, Higuchi T, Fujimoto T, Endou H, Iga D, Ohta K, Kuroda H. J Treatment effects and predictors of a 24-week course of interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1177-1183

Tong MJ, Reddy KR, Lee WM, Pockros PJ, Hoefs JC, Keeffe EB, Hollinger FB, Hathcote EJ, White H, Foust RT, Jensen DM, Krawitt EL, Fromm H, Black M, Blatt LM, Klein M, Lubina J, Consensus Interferon Study Group. Treatment of chronic hepatitis C with Consensus Interferon: A multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology* 1997; 26: 747-754

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25: 449-458

Vandelli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, Ventura E, Zanetti A. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 855-859

Velidedeoglu E, Mange KC, Frank A, Abt P, Desai NM, Markmann JW, Reddy R, Markmann JF. Factors differentially correlated with the outcome of liver transplantation in hcv+ and HCV- recipients. *Transplantation* 2004; 77: 1834-1842

Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet* 1989; 83: 1-15

Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, Lipka GM, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut* 2006; 55: 529-535

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9717-9721

Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3468-3472

Wohnsland A, Wolf PH, Sarrazin C. Viral Determinants of resistance to Treatment in Patients with Hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 23-38

Wright M, Goldin R, Fabre A, Lloyd J, Thomas H, Trepo C, Pradat P, Thursz M. Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut* 2003; 52: 574-579

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA and Cell Biology* 1991; 10: 233-238

Yatsushashi H, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M. Immunohistochemical analysis of hepatic interferon alpha-beta receptor level: relationship between receptor expression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 30: 995-1003

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 730-737

Yoshida H, Arakawa Y, Sata M, Nishiguchi S, Yano M, Fujiyama S, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 483-491

Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2004; 53: 425-430

Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, Li XG, Li SC. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated Interferon alpha-2a and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 832-836

Zabaleta A, Llopiz D, Arribillaga L, Silva L, Riezu-Boj JL, Lasarte JJ, Borrás-Cuesta F, Prieto J, Sarobe P. Vaccination against hepatitis C virus with dendritic cells transduced with an adenovirus encoding NS3 protein. *Mol Ther* 2008; 16: 210-217

Zanetti AR, Tanzi E, Newell ML. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31: 96-100

Zein CO, Zein NN. Advances in therapy for hepatitis C infection. *Microbes and Infect* 2002; 4: 1237-1246

Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G. Virushepatitis C. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 117-132

Zeuzem S, Lee JH, Franke A, Ruster B, Prümmer O, Herrmann G, Roth WK. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology*. 1998; 27: 1149-1156

Zeuzem S. Standardtherapie der akuten und chronischen Hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 714-719

Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmatic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72: 3691-3697

Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Bréchet C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999; 30: 185-191

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei

- meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung während des experimentellen Teils, die hilfreichen Anregungen und Korrekturvorschläge und die große Geduld bei der langen Reifung der Arbeit;
- meinem Mann für die stetige Unterstützung;
- meinem Bruder für die Hilfe bei Layout- und Computerproblemen;
- meinen Freunden fürs Korrekturlesen und Ermunterungen nicht aufzugeben
- und meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums.