

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss der CCR 5 Delta 32 und TNF α -308 Polymorphismen auf
das Ansprechen der Therapie bei chronischer Hepatitis C**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian G. Simperl
aus
Deggendorf
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C.Folwczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Jüngst
Prof. Dr. med. J. Haas

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Priv.Doz. Dr. med. U. Schiemann
Dr. med. J. Glas

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2008

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

„Digestion“:

Response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism.

Schiemann U, Glas J, Török P, Simperl C, Martin K, König A, Schmidt F, Schaefer M, Folwaczny C.; Digestion. 2003;68(1):1-4.

„Clinical Immunology“:

The Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon-alpha and ribavirin.

Glas J, Török HP, Simperl C, König A, Martin K, Schmidt F, Schaefer M, Schiemann U, Folwaczny C.; Clin Immunol. 2003 Jul;108(1):46-50.

Ferner erfolgten Posterpräsentationen auf dem 108. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden im April 2002 und auf der 57. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in Bonn im September 2002

Gewidmet meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung _____ **4**

1.1 Hepatits C _____ 4

1.1.1 Grundsätzliches zur Hepatitis C _____ 4

1.1.2 Epidemiologische Beobachtungen und Infektionswege _____ 4

1.1.3 Klinik und Verlauf _____ 5

1.1.4 Diagnostik _____ 6

1.1.5 Therapie _____ 7

1.2 Die Δ 32 Deletion des CCR 5 Chemokinrezeptors _____ 12

1.2.1 Chemokine und ihre Rezeptoren _____ 12

1.2.2 Der CCR 5 Chemokinrezeptor _____ 13

1.2.3 CCR 5 Δ 32 Mutation und HIV _____ 15

1.2.4 Weitere Auswirkungen der CCR 5 Δ 32 Mutation _____ 17

1.3 Der -308 TNF Promotor Polymorphismus des TNF α Rezeptors _____ 19

1.3.1 Cytokine _____ 19

1.3.2 Der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) _____ 19

1.3.3 Der -308 TNF Promotor Polymorphismus und seine Auswirkungen _____ 21

1.4 Hepatits C und Immunsystem des Patienten _____ 24

1.4.1 Hepatitis C und der CCR 5 Δ 32 Polymorphismus _____ 25

1.4.2 Hepatits C und der TNF α -308 A Polymorphismus _____ 26

2. Fragestellung _____ **27**

Inhaltsverzeichnis	2
3. Material und Methoden	28
3.1 Studienpopulation	28
3.2 Blutprobenaufarbeitung und Extraktion der DNA	30
3.3 Charakterisierung der Chemokinrezeptor 5 (CCR 5) Allele	32
3.3.1 Amplifikation der DNA	32
3.3.2 Agarosegelelektrophorese	35
3.4 Charakterisierung der -308 Tumor Nekrose Faktor (TNF) Allele	37
3.4.1 Amplifikation der DNA	37
3.4.2 Agarosegelelektrophorese	39
3.5 Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Charakterista der Studienpopulation	42
4.2 CCR 5	43
4.2.1 Häufigkeitsverteilung der Chemokinrezeptor 5 Allele	43
4.2.2 Häufigkeitsverteilung der CCR 5 Genotypen	44
4.2.3 Korrelation zwischen CCR 5 Mutation und Therapieansprechen	45
4.3 TNF α	46
4.3.1 Häufigkeitsverteilung des TNF α Allele	46
4.3.2 Häufigkeitsverteilung der TNF α Genotypen	47
4.3.3 Korrelation zwischen TNF α Mutation und Therapieansprechen	48
4.4 Korrelation zwischen Virus Genotyp und Therapie	49

Inhaltsverzeichnis	3
4.5 Zusammenfassung Ergebnisse	50
4.5.1 Zusammenfassung Ergebnisse CCR 5	50
4.5.2 Zusammenfassung Ergebnisse TNF α	50
5. Diskussion	51
5.1 CCR 5	51
5.2 TNF α	59
6. Zusammenfassung	65
7. Literaturverzeichnis	68
8. Danksagung	91
9. Lebenslauf	92

1. Einleitung

1.1 Hepatits C

1.1.1 Grundsätzliches zur Hepatitis C

Bei der Hepatitis C handelt es sich um eine weltweit verbreitete Virusinfektion, verursacht durch ein RNA-Virus aus der Flavivirus-Familie mit 6 Genotypen. Die Krankheit verläuft oft chronisch und kann zur Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms führen. Da die Klinik der Hepatits C in den meisten Fällen über Jahre bzw. Jahrzehnte asymptomatisch oder uncharakteristisch ist, wird die Erkrankung häufig nur durch serologische Untersuchungen diagnostiziert.

1.1.2 Epidemiologische Beobachtungen und Infektionswege

Die weltweite Prävalenz der Hepatitis C Infektion beträgt etwa 3 % [WHO, 1998]. Durch ein deutliches Nord-Süd Gefälle stellt sich die Prävalenz in Europa niedriger dar. In Deutschland beträgt sie ungefähr 0,3-0,8% [Heintges et al.,1994; Heintges und Wands,1997]. 70% aller chronischen Hepatitiden und 95% aller früheren „non A, non B“ Hepatitiden werden der Hepatitis C zugeschrieben [Heintges und Wands, 1997]. Zu einer Hauptrisikogruppe zählen i.v.-Drogenabhängige, bei denen 80-95% über Austausch gebrauchter Nadeln infiziert werden. Eine weitere Gruppe stellen Patienten dar, welche kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte erhalten haben. So sind ca. 60 – 70 % der Hämophiliepatienten und 5 – 20 % der Dialysepatienten mit Hepatitis C infiziert. Desweiteren kann es zu einer Infektion über sexuellen Kontakt kommen, was aber selbst nach langjährigen Beziehungen äußerst selten der Fall ist.

Zur Ansteckung kann es auch bei Neugeborenen von Müttern mit hoher Viruslast kommen, die Übertragungsrate ist aber mit unter 6 % relativ gering [Leitfeld et al., 2000]. Als unbedenklich wird das Stillen durch infizierte Mütter beschrieben [Health Nio, 1997 und EASL, 1999]. Die Infektionsgefahr bei Nadelstichverletzungen wird in der Literatur, je nach Größe der Nadel, durchschnittlich mit ca. 2 % [0 -10 %] beschrieben [Leitfeld et al., 2000]. Bei einem substantiellen Teil der Patienten lässt sich der Infektionsweg retrospektiv nicht mehr ermitteln, da er sich oft Jahrzehnte zuvor ereignet hat und die Erkrankung bis dato asymptomatisch verlaufen ist.

1.1.3 Klinik und Verlauf

Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus sowie die chronische Erkrankung verläuft bei den meisten Patienten asymptomatisch. Die Inkubationszeit beträgt etwa 8 (2 - 26) Wochen. Nur etwa ein Drittel bemerkt zu Beginn grippale Symptome und außer Müdigkeit und Leistungsminderung bleibt auch die chronische Infektion normalerweise unbemerkt. Am Anfang der Infektion stellt man gewöhnlich eine milde Transaminasenerhöhung fest. Höhere Werte oder einen Ikterus haben lediglich eine geringe Anzahl von Patienten. Bei der chronischen Hepatitis C bleiben bei einem Viertel der Patienten die Transaminasen im Normbereich, bei den anderen übersteigen sie das zwei- bis dreifache der Norm in der Regel nicht [Health Nio, 1997 und EASL, 1999]. An extrahepatischen Komplikationen ist an erster Stelle die gemischte Kryoglobulinämie mit 30 – 50 % zu nennen [Pawlotsky et al., 1998; Agnello et al., 1992; Lamprecht et al., 1998]. Desweiteren können Glomerulonephritiden, Arthritiden und Autoimmunkrankheiten, wie z.B. die Thyreoiditis auftreten.

Die Hepatitis C Infektion verläuft bei 60 - 90 % der Patienten chronisch. Das wird der hohen Replikationsrate von ca. 10^{12} pro Tag [Neumann et al., 1998] und einer hohen Mutationsrate in den hypervariablen Regionen des Genoms zugeschrieben, welche es dem Virus ermöglichen, der zytotoxischen T-Zellantwort zu entrinnen [Tsai et al., 1998]. Desweiteren wird in der Literatur bei der chronischen Erkrankung über eine zu schwache humorale und zelluläre Immunität berichtet [Rehermann et al., 1996; Lechmann et al., 1996; Botarelli et al., 1993]. Spontanheilungen, welche nur in der Anfangsphase beobachtet wurden, sind mit etwa 20 % (10 – 40 %) der Fälle selten. Genauso aber treten fulminante Verläufe nur vereinzelt auf [Neumann et al., 1998]. Eine Leberzirrhose tritt nach 10 bis 20 Jahren bei 10 – 30 % der Infizierten auf, besonders gefährdet sind Patienten männlichen Geschlechts, wenn zusätzliche Noxen wie regelmäßiger Alkoholkonsum, eine HIV- oder Hepatitis B Koinfektion vorhanden sind oder wenn die Infektion im höheren Alter erworben wurde [Poynard et al., 1997]. Die Zirrhose entwickelt sich meist symptomarm und wird oft erst durch Komplikationen entdeckt. Ein hepatozelluläres Karzinom entsteht nach Zirrhosebildung jährlich etwa in 2 – 5 % der Fälle [Serfaty et al., 1998 und Tong et al., 1995).

1.1.4 Diagnostik

Aufgrund der unspezifischen Klinik der Infektion mit dem Hepatitis C Virus stellt man die Diagnose mittels serologischer oder molekularbiologischer Tests. Diese werden oft zur Statuserhebung bei Routineuntersuchungen oder zur Abklärung unklarer Transaminasenerhöhungen durchgeführt. Dabei verwendet man als Suchtest einen ELISA („enzyme-linked immuno sorbent assay“) zweiter oder dritter Generation. Dieser erreicht eine Spezifität von über 99 % und kann eine Sensivität von ebenfalls

über 99 % erlangen [Pawlotsky et al., 1998]. Man muss jedoch berücksichtigen, dass zwischen Infektion und Nachweismöglichkeit etwa 4 - 8 Wochen vergehen. Als Bestätigungstest wird meistens die Polymerase-kettenreaktion (PCR) verwendet. Diese weist die aktive Replikation des Virus bereits nach ca. einer Woche post infectionem nach [Roggendorf et al., 1996].

1.1.5 Therapie

Die Gabe von Interferon alpha ist die Therapie mit erwiesenem Nutzen bei Hepatitis C. Dabei kommt es normalerweise zu einem Abfall des HCV RNA Spiegels [Shindo et al.,1991] und der Serumaminotransferasen-Konzentration [Hoofnagle et al.,1994; Di Bisceglie et al.,1989]. Die Therapie wird empfohlen für Patienten mit akuter Hepatitis C und für Patienten mit chronischer Erkrankung, welche eine erhöhte Serumaminotransferasen-Konzentration und/oder eine chronische Hepatitis in der Leberbiopsie aufweisen. Viele Patienten mit chronischer Hepatitis C haben normale Serumwerte der Aminotranferasen und keine Symptome einer chronischen Lebererkrankung. Für diese ist eine Therapie nicht indiziert. Die Nebenwirkungen der Therapie mit Interferon alpha sind in der Tabelle 1 dargestellt [Hoofnagle und Bisceglie, 1997].

Systemische Nebenwirkungen	Müdigkeit, Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien, Rückenschmerzen, Gewichtsverlust, Anorexie, Schwindel, Übelkeit, Diarrhoe, Bauchkrämpfe, Haarausfall, Überempfindlichkeitsreaktionen
Neurologische Nebenwirkungen	Konzentrationsstörung, Antriebslosigkeit, Schlafstörung, Delirium, Desorientierung, Koma, epileptischer Anfall, EEG-Veränderungen, Hörverlust, Tinnitus, Schwindel, Sehschwäche, retinale Blutungen und Cotton-Wool-Spots

Psychologische Nebenwirkungen	Angstgefühl, Reizbarkeit, Depression, sozialer Rückzug, Libidoverlust, paranoide und Suizid-Gedanken, erhöhte Alkohol- und Drogenabhängigkeit
Hämatologische Nebenwirkungen	Abnahme der Thrombo- und Leukozytenzahlen, sowie des Hämatokrits
Infektionen	Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, besonders Bronchitis, Sinusitis, Furunkel und Harnwegsinfektionen; in seltenen Fällen: Pneumonie, Lungenabszess, Hirnabszess, Sepsis und bakt. Peritonitis
Autoimmunologische Nebenwirkungen	Entwicklung von Autoantikörpern und anti-Interferon Antikörpern, Hyperthyreose, Hypothyreose, Lichen planus, Diabetes, hämolytische Anämie, thrombozytopenische Purpura, Lupus-ähnliche Syndrome
Weitere Nebenwirkungen	Selten: Pneumonitis, Proteinurie, interstitielle Nephritis, nephrotisches Syndrom, Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, akute Exazerbation von Lebererkrankungen

Tabelle 1: Nebenwirkungen der Therapie mit Interferon alpha

Das Ansprechen der Therapie kann mittels Messung der Serumaminotransferasen-Konzentrationen und der HCV RNA Spiegel überwacht werden. Dabei sinken bei den meisten Erkrankten die Serumaminotransferasen-Konzentration und die HCV RNA Spiegel ab. Nach Beendigung der Monotherapie mit Interferon erleiden allerdings viele Patienten einen Rückfall und die Werte steigen wieder an, so dass sechs Monate nach der Therapie mit Interferon alpha bei nur 10 - 20% der Behandelten eine normale Serumaminotransferasen-Konzentration und keine HCV RNA messbar ist [Hoofnagle et al., 1994 und Poynard et al., 1996]. Dabei gibt es mehrere klinische und serologische Kriterien, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Therapieerfolg anzeigen. Die zwei wichtigsten sind ein niedriger HCV RNA Spiegel und der Genotyp des Virus. Dabei haben Patienten mit HCV RNA unter 100 000

Kopien pro Milliliter ein gutes Langzeit-Ansprechen, im Gegensatz zu denjenigen mit Werten über 2 Millionen pro Milliliter. Infizierte mit den Genotypen 2 oder 3 haben eine Ansprechrate von über 40 %, während sie bei Patienten mit Genotyp 1 nur bei unter 10% liegt [Hoofnagle und Blisceglie, 1997]. Weitere Kriterien für den Langzeiterfolg sind ein Alter unter 45 Jahren, eine Krankheitsdauer von unter 5 Jahren, weibliches Geschlecht, nur minimale histologische Veränderungen und geringe Eisenkonzentrationen in der Leber sowie geringe genetische Vielfalt des Hepatitis C Virus [Kanazawa et al., 1994 und Enomoto et al., 1995].

Bei Studien zu neuen Therapiemöglichkeiten senkte Ribavirin die Serumaminotransferasen-Konzentration bei 50 - 60 % der Patienten, allerdings nur während der Einnahmedauer, und führte bei zwölf monatiger Behandlung zur Verbesserung des histologischen Befundes. Die HCV RNA Konzentration im Serum änderte sich jedoch nicht [Di Bisceglie et al., 1995]. Ribavirin ist ein synthetisches Guanosinnukleosidanalogen mit antiviraler Aktivität in vitro gegen eine Reihe von RNA und DNA Viren [Patterson et al., 1990 und Ning et al., 1998]. In einer Kombinationstherapie mit Interferon alpha zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Langzeiterfolges. In einer Vergleichsstudie zwischen alleiniger Gabe von Interferon alpha und einer Kombinationstherapie mit Ribavirin verbesserte sich die Rate der Responder (kein HCV RNA Nachweis im Serum, 24 Wochen nach Therapieende) von 13 % mit Monotherapie auf 38 % mit Kombinationstherapie [McHutchison et al., 1998]. Sehr ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Vergleichsstudie von Poynard [Poynard et al, 1998]. Die wichtigste Nebenwirkung der Ribavirintherapie ist ein reversibler Hämoglobinabfall, weswegen die Blutwerte der Patienten immer kontrolliert werden sollten [McHutchison et al., 1998].

Eine weitere Verbesserung des Therapieansprechens konnte durch pegyliertes Interferon erreicht werden. PEG Interferon entsteht durch konvalente Bindung von

Polyethylenglykol an das synthetische, rekombinante Interferon-Molekül. Durch bis zur zehnfachen Verlängerung der Halbwertszeit mit konstanten Wirkspiegeln, im Gegensatz zu dem nicht pegylierten Interferon, kommt es zu einer kontinuierlichen Suppression der Virämie mit verbesserter Wirksamkeit in den Langzeitergebnissen [Friedrich-Rust et al., 2004]. Die Kombinationstherapie mit PEG-Interferon und Ribavirin ist der aktuelle Standard in der Therapie.

Die optimale Dosierung und die Dauer der Kombinationstherapie sind jedoch noch Gegenstand von Debatten. Verschieden Studien zeigten, dass die Therapiedauer von 48 auf 24 Wochen reduziert werden kann ohne den Therapieausgang zu kompromittieren [Zeuzem et al., 2004; Hadziyannis et al., 2004; McHutchison et al., 1998]. Kürzere Therapiezeiten sind mit besserer Verträglichkeit und geringeren Abbruchraten assoziiert. Wie oben erwähnt, ist ein entscheidender Faktor für den Therapieausgang der Virusgenotyp. Desweiteren sagte in verschiedenen Studien ein frühzeitiges Therapieansprechen ein anhaltendes, positives Therapieergebnis vorher [Zeuzem et al., 2001; Neumann et al., 1998]. In neueren Studien wurde nun nachgewiesen, dass bei HCV-2 und -3 infizierten Patienten mit schnellem Therapieansprechen (nach 4 Wochen kein HCV RNA Nachweis) eine Reduzierung der Therapiedauer auf 12 - 16 Wochen ohne signifikante Auswirkung auf das Langzeitergebnis möglich ist [Wagner et al., 2005; Mangia et al., 2005]. Ebenfalls stellte sich in diesen Untersuchungen ein besserer Therapieausgang für HCV-2 gegenüber HCV-3 Patienten dar. In anderen Studien zeigte sich in bestimmten Fällen ein vorteilhafter Effekt einer verlängerten Therapiedauer (48 Wochen) nur bei HCV Genotyp 1 Patienten, nicht jedoch bei HCV-2 und -3 Patienten [Poynard et al., 1998; McHutchinson et al., 1998].

Der Trend wird in Zukunft in einem jeweils individuellen Therapieschema liegen, abgestimmt auf spezifische Parameter, um den Therapieausgang, Nebenwirkungen und Kosten zu optimieren.

1.2 Die $\Delta 32$ Deletion des CCR 5 Chemokinrezeptors

1.2.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Die Steuerung der Leukozyten zum Ort des immunologischen Geschehens ist von essentieller Bedeutung für die Immunabwehr. Sie wird durch zwei entscheidende Schritte bestimmt. Erstens durch die Adhäsion der Leukozyten in der Blutbahn an der Oberfläche des Gefäßendothels und zweitens durch die Migration derselbigen durch das Endothel in das Interstitium.

Dass bei beiden Schritten unter anderem chemotaktische Cytokine (Chemokine), kleine Glykoproteine, und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen, ist seit längerem bekannt. Dabei ist es den Leukozyten möglich mit unterschiedlichen Chemokinen zu interagieren. Das erlaubt ihnen die Migration durch das Endothel mittels des einen Chemokinrezeptors und durch das Interstitium mittels eines anderen, um schließlich das Zielgebiet wieder mit einem anderen Rezeptor zu erreichen [Springer et al., 1994].

Chemokine sind wegen ihrer großen Anzahl, übergreifenden Rezeptorspezifität und phylogenetischen Divergenz mit einer der komplexesten Liganden. Bis heute sind mehr als 40 unterschiedliche Chemokine entdeckt worden. Die Chemokine können dabei aufgrund ihrer Struktur (Anzahl und Ort der Cysteinmoleküle) in vier Gruppen mit den Namen CXC, CC, C und CXC3C aufgeteilt werden [Murphy et al., 2000]. Eine andere Klassifikation differenziert sie nach ihrer Funktion. Dabei wird unterschieden, ob die Chemokine bei entzündlichen Prozessen oder bei der Aufrechterhaltung der Homeostase des Immunsystems beteiligt sind bzw. bei beiden Vorgängen eine Rolle spielen [Cyster et al., 1999]. Dabei werden sie von einer ganzen Reihe von Zellen produziert, wie Monozyten, T Lymphozyten, dendritische

Zellen, natürliche Killerzellen, Epi- und Endothelzellen und Hepatozyten [Strieter et al., 1996].

Von den Chemokinrezeptoren sind uns bis heute 18 bekannt. Dabei handelt es sich um G Protein gekoppelte Rezeptoren. Obwohl die meisten Chemokinrezeptoren mehr als ein Chemokin binden, sind diese fast immer ausschließlich aus einer Gruppe. Je nach ihrer Gruppenspezifität sind sie benannt in CXCR1 - 5, CCR 1 – 11, XCR1 und CX3CR1 (dabei steht das R für Rezeptor). Die für die verschiedenen Rezeptoren kodierenden Sequenzen haben dabei eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 25 bis 80 %. Die Länge der Proteine liegt dabei zwischen 340 und 370 Aminosäuren [Murphey et al., 2000]. Die Hauptaufgabe der Rezeptoren liegt in der Steuerung der Leukozyten bei der Regulierung des Immunsystems, der unspezifischen und spezifischen Immunantwort; sie sind aber auch in verschiedenen pathologischen Entzündungen involviert [Springer et al., 1994; Foxman et al., 1997]. Desweiteren spielen sie eine spezielle Rolle bei der Hämatopoese [Broxmeyer et al., 1996], der Angiogenese (Salcedo et al., 1999), bei der Entwicklung des Organismus generell [Forster et al., 1996; Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998] und paradoxerweise auch bei der Entstehung bestimmter Infektionen.

Obwohl hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert, sind die Chemokinrezeptoren in bestimmten Fällen auch auf Endothelzellen, Neuronen, Epithelzellen und Mikrogliazellen des Gehirns zu finden [Hadley et al., 1994; He et al., 1997; Horuk et al., 1997; Gupta et al., 1998; Salcedo et al., 1999].

1.2.2 Der CCR 5 Chemokinrezeptor

Zu der oben genannten Gruppe der CC-Chemokinrezeptoren, auch als β -Chemokinrezeptoren bezeichnet, gehört der CCR 5 Chemokinrezeptor. Auch

bekannt unter dem Namen CC-CKR5, Chem R13 oder CMKBR5. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 liegt an Position 21 seine kodierende Sequenz. Diese wird in ein Protein von 355 Aminosäuren-Länge translatiert [Murphy et al. 2000].

Der CCR 5 Chemokinrezeptor ist vor allem auf T-Helferzellen vom Typ 1 (TH1-Zellen) und auf Monozyten zu finden [Loetscher et al., 1998]; ferner aber auch an T-Gedächtniszellen, Stammzellen, dendritische Zellen und Mikroglia [Murphy et al., 2000]. Die TH1-Zellen regulieren hauptsächlich die zelluläre Immunabwehr und sind in der Entstehung chronischer Entzündungsprozesse beteiligt. T-Helferzellen vom Typ 2 (TH2-Zellen) sind durch Förderung der Ig E - Produktion in der Pathogenese von allergischen Reaktionen maßgeblich beteiligt und unterstützen die humorale Immunabwehr. Die TH2-Zellen exprimieren jedoch nicht den CCR 5 Rezeptor [Bonecchi et al., 1998].

An den CCR 5-Chemokinrezeptor binden meist die Liganden MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Weitere Einzelheiten zu den Liganden sind in Tabelle 2 [Moser und Loetscher, 2001] zusammengefasst. Wobei zur Zeit CCR 5 der einzige bekannte Rezeptor für MIP-1 β ist [Zhou et al., 1998]. Ebenso werden MCP1 - 4 und Eotaxin gebunden.

Chemokin	Zelluläre Herkunft	Hauptsächliche Funktion
MIP-1α	Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen	Chemotaxis von Monozyten, T-Zellen Hemmung der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen
MIP-1β	Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile, Mastzellen	Chemotaxis von Monozyten, T-Zellen Hemmung der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen

RANTES	Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, Mesangialzellen	Chemotaxis von Monozyten, T-Zellen, Eosinophilen
---------------	---	--

Tabelle 2: Liganden des CCR 5 Chemokinrezeptors (MIP = „macrophage inflammatory protein“; RANTES = „regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted“) modifiziert nach Moser und Loetscher, 2001.

Die Liganden RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β sind bei vielen entzündlichen Geschehen zu finden [Strieter et al., 1996]. Daher verwundert es nicht, dass zum Beispiel in der Synovialflüssigkeit eines Patienten mit rheumatoider Arthritis mehr als 85 % T-Lymphozyten mit CCR 5 Rezeptoren gefunden werden im Gegensatz zu 5 - 10 % im Blut oder lymphatischen Gewebe [Loetscher et al., 1998].

Desweiteren wird die Expression von dem CCR 5 Rezeptor u.a. durch verschiedenen Interleukine verstärkt (z. B. Interleukin 2) [Sallusto et al., 1998].

1.2.3 CCR 5 Δ 32 Mutation und HIV

Im Jahre 1995 wurde entdeckt, dass RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β die Ausbreitung von HIV-1-Viren hemmen [Cocchi et al., 1995]. Im Juni 1996 berichteten innerhalb einer Woche fünf von einander unabhängige Gruppen, dass es sich bei dem CCR 5 Rezeptor um einen Korezeptor für m-trope HIV-1-Stämme handelt [Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Doranz et al., 1996]. In den nächsten Monaten wurde entdeckt, dass gegenüber m-tropen HIV-1 exponierten Individuen mit einer Δ 32-Mutation des CCR 5 Gens einen Schutz gegen die Infektion haben [Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996]. Bei der Δ 32-Mutation handelt es sich um eine Deletion von 32

Basenpaaren im CCR 5 Gen. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters an Aminosäurenstelle 185 und daraus resultierend zur Expression eines defekten Proteins. Dieses funktioniert weder als Chemokinrezeptor noch als Korezeptor für das HIV-Virus.

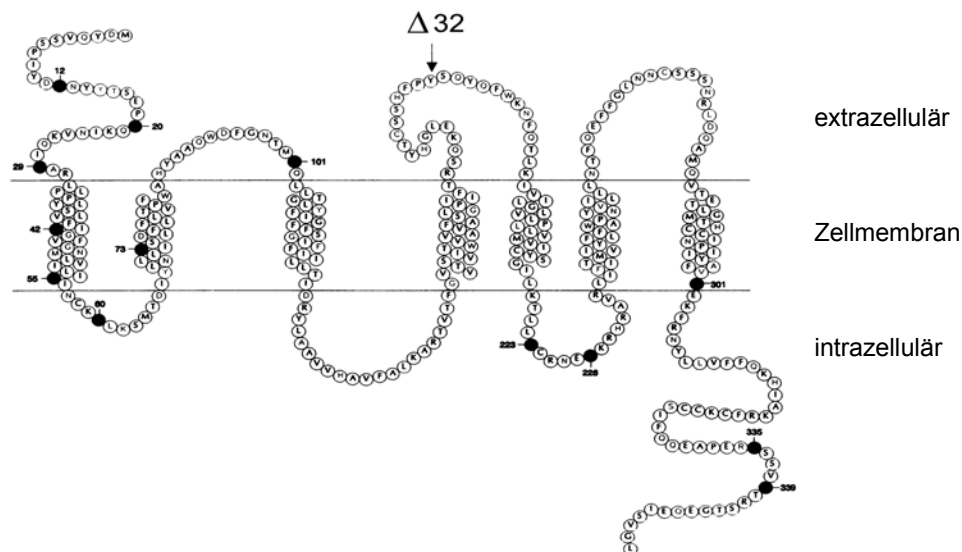


Abbildung 1: Darstellung des CCR 5 Rezeptors; der Pfeil zeigt auf die durch die $\Delta 32$ Mutation beeinträchtigte Region [Carrington et al., 1997].

Bei Kaukasiern findet sich die $\Delta 32$ -Mutation mit einer Allelfrequenz von 9,2 %, einer Homozygotenfrequenz von 1,1 % und einer Heterozygotenfrequenz von 16,2 % [Samson et al., 1996]. Sie nimmt von Nord- nach Südeuropa ab und fehlt bei Afrikanern und Asiaten [Huang et al., 1996; Samson et al., 1996]. Daraus schloss man auf ihre Entstehung in Nordeuropa und schätzte ihr Alter auf ca. 4000 Jahre [Carrington et al., 1997].

Wie oben erwähnt, besteht bei homozygoten Merkmalsträgern der $\Delta 32$ -Mutation eine Resistenz gegenüber m-tropen HIV-1-Stämmen. Nicht jedoch gegenüber t-tropen HIV-1-Stämmen, da diese CXCR4-Chemokinrezeptoren als Korezeptoren

nutzen. Die Heterozygoten für CCR5 Δ 32 haben im Gegensatz zu den Wildtypen eine reduzierte Expression des funktionierenden Rezeptors in ihren Zellen [Benkirane et al., 1997] und im Falle einer HIV-1 Infektion wurde in einigen Kohorten ein langsames Absinken der T-Helferzellen, eine niedrigere Viruslast und eine langsamere Progression zu AIDS beobachtet [Dean et al., 1996, Huang et al., 1996, Michael et al., 1997].

1.2.4 Weitere Auswirkungen der CCR 5 Δ 32 Mutation

Individuen mit der CCR 5 Deletion scheinen durch die Mutation keine offensichtliche Probleme zu haben und wirken völlig gesund. Ebenso wie Knock-out Mäuse, deren CCR 5 Gen künstlich ausgeschaltet wurde. Untersuchungen an diesen Mäusen zeigten jedoch bestimmte Auffälligkeiten.

Mit *Listeria monocytogenes* infizierte Knock-out Mäuse hatten in der Leber zehnfach höhere Titer an dem intrazellulären Bakterium als die Wildtyp-Kontrollgruppe und damit eine höhere Anfälligkeit. Ebenso ist diese erhöht bei einer Kryptokokkusinfektion [Huffnagle et al., 1999]. Andererseits zeigten die homozygoten Mäuse eine gewisse Resistenz gegenüber der Lipopolysaccharid induzierten Endotoxämie.

Desweiteren zeigten diese Mäuse eine verstärkte allergische Reaktion vom Spättyp und eine verstärkte humorale Immunantwort bei einem Antigenstimulus auf T-Zellen, was auf eine Rolle von CCR 5 in der Herunterregulierung der T-Zell abhängigen Immunantwort hinweist [Zhou et al., 1998].

Auch beim Menschen wurde die CCR 5 Δ 32-Mutation in Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen untersucht:

So stellte Garred fest, dass CCR 5 Δ 32 Allel-Träger mit chronischer Polyarthritits vermindert positiven IgM Rheumafaktor, geschwollene Gelenke und eine verkürzte Dauer der Morgensteifigkeit aufwiesen. Das Auftreten der Deletion in dieser Gruppe unterschied sich jedoch nicht von dem in der Kontrollgruppe [Garred et al., 1998].

Bei Sarkoidose beschreibt Petrék eine erhöhte Frequenz der Δ 32 Mutation bei diesen Patienten und infolge schwerer Krankheitsverläufe einen erhöhten Kortikoidbedarf [Petrék et al., 2000].

Einerseits wird ein vermindertes Risiko für die Entwicklung von Asthma bei CCR 5 Δ 32 Allel-Träger und das Fehlen von homozygoten Asthmatikern beschrieben [Hall et al., 1999]. Andererseits wird jeder Bezug der CCR5 Mutation mit Asthma negiert [Mitchell et al., 2000].

Desweiteren wurde bei zwar gleicher Inzidenz von multipler Sklerose eine niedrigere Rezidivrate bei Δ 32 Allel-Trägern beobachtet [Sellebjerg et al., 2000].

Das für CCR 5 kodierende Gen ist nahe dem Mikrosatelliten Marker D3S1573 lokalisiert, welcher mit entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang gebracht wird. Martins Untersuchungen ergaben jedoch keine Assoziation zwischen der Delta 32 Mutation des CCR 5 Gens und Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn [Martin et al., 2001].

Nyugen beschrieb bei homozygoten Merkmalsträgern erhöhte Blutdruckwerte und Lymphozytenzahlen [Nguyen et al., 1999].

1.3 Der -308 TNF Promotor Polymorphismus des TNF α Rezeptors

1.3.1 Cytokine

Bei Cytokinen (Zytokinen) handelt es sich um Polypeptide/Proteine mit einer Molekülmasse meist unter 30 kDa, welche vor allem die Proliferation und die Differenzierung von Zielzellen regulieren. Sie werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Viele Cytokine spielen außerdem eine sehr wichtige Rolle bei immunologischen Reaktionen. Diese werden dann im allgemeinen als Mediatoren bezeichnet. Sie werden meist nur bei akutem Bedarf produziert und haben gewöhnlich nur eine kurze Lebenszeit, damit verbunden eine geringe Reichweite. Cytokine sind nicht alle untereinander verwandt und gehören daher zu unterschiedlichen Strukturfamilien. Innerhalb dieser Strukturfamilien sind die Proteine jedoch homolog. Die Bindung findet außerordentlich spezifisch an spezielle Rezeptoren der Zelloberfläche statt. Dabei binden strukturell homologe Cytokine häufig an denselben Typ von Rezeptor.

1.3.2 Der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)

Ebenfalls zur Gruppe der Cytokine zählt der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), auch Cachectin genannt. Sein namensgebendes Charakteristikum ist die Auslösung von Nekrose im Tumorgewebe in vivo bei Mäusen, welche an einem Karzinom erkrankt sind.

Sein kodierendes Gen ist in der hoch polymorphen MHC (Major Histocompatibility Complex) Region auf dem Chromosom 6 an Position 21.3 lokalisiert [Hajeer et al., 2000]. TNF α wird als 26 kDa schweres, membrangebundenes Protein exprimiert

und dann durch das TNF α Converting Enzym (TACE) zu dem aktiven 17 kDa löslichen Trimer gespalten.

Es spielt eine Rolle bei Tumorbekämpfung, Immunmodulation, Entzündungsprozessen, Kachexie, septischem Schock, Replikation von Viren und Hämatopoese. TNF α wird dabei von vielen Zelltypen exprimiert, aber hauptsächlich von Makrophagen bei immunologischen Geschehen [Vaselli et al., 1992].



Abbildung 2: Kristallstruktur des Tumor Nekrose Faktors α modifiziert nach Eck et al., 1989.

TNF α wirkt durch Bindung an TNF-Rezeptoren, welche an nahezu allen Zellen im Körper zu finden sind. Die Familie der TNF-Rezeptoren ist groß. Die Funktion der beiden erst entdeckten, TNFR 1 und TNFR2 (R=Rezeptor), ist jedoch gut untersucht. Der TNFR 2 hat eine höhere Affinität zu TNF α und bindet es somit besser bei geringen Konzentrationen. Dieser Rezeptor scheint proinflammatorische Reaktion zu induzieren. Dagegen benötigt der TNFR 1 höhere Konzentrationen und gibt das Signal für den Zelltod durch Apoptosis oder Zytotoxizität [Tartaglia et al., 1991].

Somit hat die Menge des produzierten TNF α einen Einfluß auf die Art der Immunantwort.

Auch kommt es durch die beiden TNF-Rezeptoren zu einer Inhibition der TNF α Produktion [Peschon et al., 1998]. Ebenso können beide Rezeptoren von der Zelloberfläche abgespalten werden und in löslicher Form das aktive TNF α neutralisieren [Heller et al., 1990; Kohno et al., 1990]. Die genaue physiologische Rolle der löslichen TNF-Rezeptoren ist nicht bekannt. Sie könnten jedoch genutzt werden, um mittels Neutralisation von aktiven TNF α den Entzündungsprozess zu lokalisieren und damit andere Zellen zu schützen [Nelson et al., 1997].

TNF α stimuliert auch die Produktion von Fibroblasten sowie anderer Zellreihen und aktiviert polymorphe Neutrophile und Osteoklasten. Außerdem induziert TNF α die Produktion von Interleukin 1, Interleukin 6, Prostaglandin E2 und Kollagenase.

1.3.3 Der -308 TNF Promotor Polymorphismus und seine Auswirkungen

Wie oben schon erwähnt, befindet sich der Genlocus für TNF α innerhalb des MHC (Major Histocompatibility Complex). Dieser ist die polymorpheste Region des gesamten Genoms mit den am dichtesten nebeneinander liegenden Genen. So verwundert es nicht, dass viele „single nucleotide“ Polymorphismen (SNP's) innerhalb und um das TNF α Gen gefunden wurden. Sie befinden sich dem Gen vorgeschaltet an den Positionen -1031, -863, -857, -851, -488, -419, -376, -308, -238, -163 und -49 relativ gesehen zum Startpunkt der Transkription [Mira et al., 1999; D'Alfonso und Richiardi, 1996]. Meist kommt es bei den SNP's zu einem Wechsel von Guanin (G) zu Adenosin (A) an den oben genannten Stellen. In vielen Studien wurde nun untersucht inwiefern diese Polymorphismen einen Einfluß auf die TNF α Produktion und somit auf bestimmte Krankheitsverläufe haben.

In dieser Arbeit wurde der SNP von G (TNF 1 Allel) zu A (TNF 2 Allel) an der Stelle -308 in der Promotorregion von TNF α untersucht, welches mit dem an Stelle -238 am besten erforscht ist.

Vier von einander unabhängige Gruppen haben mittels unterschiedlichen Reporter-Gen-Konstrukten, mit denen man das Ausmaß der Genaktivierung feststellen kann, gezeigt, dass das TNF α -308 A (TNF 2) Allel eine höhere Transkriptionsrate im Vergleich zu dem TNF α -308 G (TNF 1) Allel hat [Braun et al., 1996; Wu und McClain, 1997; Wilson et al., 1997, Kroeger et al., 1997]. Ebenfalls wurde bei in vitro stimulierten Zellen mit dem TNF 2 Allel eine höhere TNF α Konzentration im Gegensatz zu Zellen mit TNF 1 gemessen [Bouma et al, 1996; Louis et al, 1998]. Manche Gruppen sahen jedoch keinen Unterschied in der TNF α Produktion zwischen den beiden Allelen [He et al., 1995; Huizinga et al., 1997; Turner et al., 1995].

Jedenfalls wurde der TNF α -308 Polymorphismus mit unterschiedlichen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen und Karzinomen in Zusammenhang gebracht:

Die vielleicht bekannteste Studie ist die Assoziation von TNF α -308 A Allel mit der cerebralen Malaria in Gambia. Mit dem TNF -308 A Genotyp hatten Malariapatienten ein vierfach höheres Risiko eine cerebrale Malaria und ein sieben- bis achtfaches Risiko neurologische Folgeerkrankungen zu entwickeln [McGuire et al., 1994].

Ebenfalls wurde das TNF2 Allel mit einem schwerwiegenderen Ausgang der Leishmaniose brasiliensis in Venezuela in Zusammenhang gebracht [Cabrera et al., 1995].

Homozygote -308 A Träger haben auch ein 3,4 fach höheres Risiko an dem Trachom zu erkranken. Diese chronische Augenentzündung verursacht die meisten Erblindungen weltweit [Conway et al., 1997].

Bei Meningokokken-Meningitis wird die Schwere der Erkrankung sowie das Sterberisiko mit TNF 2 in Verbindung gebracht [Nadel et al., 1996].

Das sehr verbreitete Zytomegalievirus (CMV) war in einer gesunden Population bei -308 A Trägern weniger oft zu finden [Hurm und Helminen, 1998].

Auch scheinen diese Personen einen gewissen Schutz vor dem Denguefieber zu haben [Loke et al., 1996].

Ebenfalls eine Assoziation mit dem TNF 2 Allel haben der Systemische Lupus Erythematosus (SLE) und der Diabetes mellitus Typ I, wobei die starke Verbindung des -308 Polymorphismus zu dem MHC Haplotyp HLA-A1, B8, DR3 eine entscheidende Rolle spielt.

Daneben gibt es Verknüpfungen des TNF Allels mit der Dermatitis Herpetiformis [Wilson et al., 1995], Alopecia Areata [Galbraith und Pandey, 1995] und verschiedenen Formen von Psoriasis [Arias et al., 1997].

Es zeigte sich ebenso eine Assoziation der Mutation mit der primär sklerosierenden Cholangitis [Bernal et al., 1999, Mitchell et al., 1998] und der primär biliären Zirrhose [Jones et al., 1999], desgleichen bei gastrointestinalen Entzündungen wie Morbus Crohn [Louis et al., 1996] und Colitis Ulcerosa [Bouma et al., 1996].

Auch besteht ein höheres Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion von Herz- [Turner et al., 1995] und Nierentransplantaten [Sankaran et al., 1999] bei Organempfängern mit dem TNF α -308 A Allel.

Und zuletzt scheint TNF 2 in Bezug zu dem krankheitsfreien Intervall und der Überlebenschance bei Non Hodgkin Lymphomen zu stehen [Warzocha et al., 1998]. Ebenfalls wurde eine Assoziation des TNF -308 Allels zu der chronischen lymphatischen Leukämie hergestellt [Demeter et al., 1997].

1.4 Hepatitis C und Immunsystem des Patienten

Der genaue Pathomechanismus der zur Viruspersistenz und zum Leberzellschaden bei der Hepatitis C führt, ist noch nicht vollends verstanden. Desgleichen stehen noch viele Fragen zu dem Therapieansatz und –erfolg offen.

Die Immunantwort scheint eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HCV Infektion zu spielen und verschiedene Argumente unterstreichen die Relevanz des durch das Immunsystem vermittelten Leberzellschadens:

- Zu Beginn der Erkrankung fällt der Leberzellschaden mit der Ausbildung der Immunantwort zeitlich zusammen und nicht mit der Infektion und Virusreplikation [Farci et al., 1996]
- Verschiedene Daten deuten daraufhin, dass das HCV kein zytolytisches Virus ist, jedoch Einfluß auf die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren hat [Tanaka et al., 1996]
- Immunsupprimierte Patienten mit HCV-Infektion zeigen eine transiente Normalisierung der Transaminasen und einen Anstieg der Virämie; daraus folgend scheint der Zellschaden und die Kontrolle der Virusreplikation durch das Immunsystem vermittelt zu sein; ebenfalls zeigt sich beim Wegfall der Immunsuppression eine Exzerbation der Hepatitis [Gruber et al., 1993; Fan et al., 1991]

Wie oben ausführlich beschrieben, haben der CCR 5 Rezeptor und seine Liganden sowie der Tumornekrosefaktor α wichtige Aufgaben innerhalb des Immunsystems. Ebenso wirken sich ihre Polymorphismen modulierend auf dieses System aus und daraus resultierende Folgen für bestimmte Krankheitsverläufe.

Insofern liegt die Frage nahe, ob diese Polymorphismen des CCR 5 Rezeptors sowie des TNF α auch den Krankheitsverlauf und die Therapie der Hepatitis C Infektion beeinflussen.

1.4.1 Hepatitis C und der CCR 5 Δ 32 Polymorphismus

Der CCR 5 Chemokinrezeptor ist bedeutend für die Anfälligkeit oder Beseitigung bestimmter Infektionen, ausgelöst durch Pilze, Protozoen und Bakterien [Nansen et al., 2002]. Seine Rolle bei antiviralen Aktivitäten ist weniger gut untersucht.

Der CCR 5 Rezeptor vermittelt eine Aktivierung, Stimulierung und Differenzierung der T-Zellen und Monozyten während der Immunantwort [Strieter et al., 1996]. Alle diese Prozesse spielen eine Rolle in der Hepatitis C Virus Clearance und Persistenz und könnten durch den Verlust des funktionsfähigen CCR 5 Rezeptors modifiziert werden.

Somit stellt sich die Frage, inwiefern der CCR 5 Δ 32 Polymorphismus den Verlauf einer chronischen Hepatitis C und deren Therapie mittels Interferon und Ribavirin beeinflusst.

In der Literatur finden sich dazu widersprüchliche Aussagen. Woitas et al., 2002 und Nguyen et al., 1999 entdeckten ein vermehrtes Vorkommen des CCR 5 Δ 32 Polymorphismus bei Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu einer jeweils gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse konnten jedoch von anderen Arbeitsgruppen [Promrat et al., 2003; Dorak et al., 2002; Hellier et al., 2002] nicht bestätigt werden. Auch zeigte sich keine Assoziation zwischen der CCR Δ 32 Deletion und dem Therapieansprechen [Promrat et al., 2003; Dorak et al., 2002].

1.4.2 Hepatitis C und der TNF α -308 A Polymorphismus

Das Cytokin TNF α ist ein elementarer Mediator der Immunantwort mit multiplen biologischen Funktionen, wie direkte antivirale Aktivität, Zytotoxizität gegen virusinfizierte Zellen sowie für mehrere immunmodulatorische Maßnahmen [Vilcek et al., 1991].

Untersuchungen an entzündetem Lebergewebe bei chronischer Hepatitis C mittels Immunphänotypisierung zeigten, dass die Mehrzahl der infiltrierenden Zellen T-Zellen sind [Onji et al., 1992]. Wenn T-Zell vermittelte Mechanismen bedeutend in der Pathogenese der Hepatitis C Infektion sind, so dürfte auch das TNF α System als wichtiger Mediator in der T-Zell vermittelten Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Somit könnte auch der TNF α -308 A Polymorphismus, welcher mit einer höheren Transkriptionsrate einhergeht [Braun et al., 1996; Wu und McClain, 1997; Wilson et al., 1997; Kroeger et al., 1997], in dem Entzündungsprozess der chronischen Hepatitis C und deren Therapieausgang eine bedeutende Funktion haben.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen [Höhler et al., 1998; Rosen et al., 2002; Yee et al., 2001] haben bis jetzt jedoch noch keinen Anhalt für ein vermehrtes Auftreten des TNF α -308 A Polymorphismus bei Patienten mit chronischer Hepatitis C gefunden. Auch konnte keine Verbindung zwischen dem Polymorphismus und dem Therapieansprechen hergestellt werden [Rosen et al., 2002; Yee et al., 2001].

Weitere Untersuchungen sind jedoch zur Abklärung der bisherigen Erkenntnisse nötig.

2. Fragestellung

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, haben der CCR 5 Δ 32 Polymorphismus und der TNF α -308 A Polymorphismus einen Einfluss auf das Immunsystem und den Verlauf verschiedener Erkrankungen. Denkbar ist auch das Einwirken dieser Polymorphismen auf die Ausbildung einer chronischen Hepatitis C sowie auf den Therapieverlauf und dessen Ausgang.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen über das Auftreten des CCR 5 Δ 32 Polymorphismus bei HCV Patienten [Woitas et al., 2002; Nguyen et al., 1999; Promrat et al., 2003; Dorak et al., 2002; Hellier et al., 2002]. Dagegen konnte der TNF α -308 A Polymorphismus in verschiedenen Arbeitsgruppen [Höhler et al., 1998; Rosen et al., 2002; Yee et al., 2001] nicht vermehrt nachgewiesen werden. Auch bezüglich des Therapieansprechens auf Interferon und Ribavirin wurde von den o. g. Arbeitsgruppen keine Assoziation zu den beiden Polymorphismen entdeckt.

Um die heterologe Studienlage zu überprüfen, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Genotyp- und Allelfrequenzen der Δ 32 Deletion des CCR 5 Rezeptors und des TNF α -308 Single Nukleotid Polymorphismus von G zu A bei Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht werden. Diese wurden mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Desweiteren sollten diese Polymorphismen auf eine Assoziation mit dem Therapieansprechen auf Interferon und Ribavirin bei der chronischen Hepatitis C überprüft werden.

Abschließend sollten die Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage in Kontext gebracht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation setzt sich aus 62 Patienten zusammen, die sich zwischen 1998 und 2000 in ambulanter oder stationärer Betreuung in der Gastroenterologie (Standort Innenstadt) und/oder Psychiatrie der Universitätsklinik München befanden. Alle Studienteilnehmer waren Kaukasier. Die Patienten nahmen an einer Studie zur Untersuchung der Compliance und psychischen Nebenwirkungen während der Behandlung der Hepatitis C mit Interferon alpha und Ribaverin in psychiatrischen Risikogruppen teil [Schaefer et al., 2003]. Die Untersuchungen wurden von dem Ethik-Komitee der Universität München genehmigt und alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Das Patientenkollektiv bestand aus Patienten mit chronischer Hepatitis C und

- bestehenden psychiatrischen Erkrankungen
- welche ein Methadon Substitutionsprogramm durchlaufen
- bekannter früherer intravenöser Drogenabhängigkeit
- auf die keine der oben genannten Kriterien zutrifft

Medizinische Einschlusskriterien der Patienten waren ein nachweisbarer HCV RNA Wert in einer Polymerase Kettenreaktion Untersuchung (AMPLICOR; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) für mehr als 6 Monate und erhöhte Alanin-Aminotransferase Werte (ALT > 30 U/L; Referenzbereich < 24 U/L).

Ausschlusskriterien waren:

- Bestehen einer anderen Lebererkrankung
- Leberzirrhose Grad Child B oder Child C
- schwergradige kardiologische oder neurologische Erkrankungen
- Koinfektion mit Hepatitis B
- Koinfektion mit Human Immunodeficiency Virus (HIV)
- Hepatozelluläres Karzinom
- Autoimmunerkrankungen
- Neutrophilenzahl unter $1\,500/\text{mm}^3$ [Lauer et al., 2001]
- Thrombozytenzahl unter $75\,000/\text{mm}^3$ [Lauer et al., 2001]

Die Patienten wurden drei Monate vor Therapiebeginn auf Drogen- und Alkoholmissbrauch getestet. Vor und während der Beobachtungsphase wurden alle vier Wochen Urinkontrollen auf Heroin, Methadon, Kokain, Amphetamine und Benzodiazepine durchgeführt. Desweiteren wurde der psychiatrische Status der Patienten anhand standardisierter Scans erhoben.

Alle Patienten wurden während der ersten acht Wochen der Behandlung alle 14 Tage durch einen Hepatologen und Psychiater betreut. Danach alle vier Wochen in der Ambulanz.

Jeder Patient wurde dreimal wöchentlich mittels IFN- α -2a (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) 3 MU und täglich mit Ribavirin (MEDUNA GmbH, Hannover, Deutschland) 1 000 bis 1 200 mg, abhängig vom Körpergewicht ($< 75\text{ kg} = 1\,000\text{ mg}$), behandelt. Die Dosis von Ribavirin wurde bei Anämie und klinischen Symptomen adaptiert (Minimaldosis 600 mg/d). Die Patienten verabreichten sich selbst subkutan die IFN α Injektion.

Als Kontrollen diente das Blut von 119 gesunden, unverwandten Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes in München.

3.2 Blutprobenaufarbeitung und Extraktion der DNA

Bei jedem Patienten erfolgte die Blutentnahme von 10 ml venösem EDTA-Vollblut (Firma Sarstedt, Nürnberg). Danach wurde dieses fünf Minuten bei 3600 U/min (Firma Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert und anschließend das Plasma abpipettiert (Firma Eppendorf, Hamburg). Die darauf folgende mittlere, leukozytenreiche Phase, auch „buffy coat“ genannt, wurde vorsichtig abpipettiert und in nummerierte und beschriftete „Cryotubes“ (Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen) übertragen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° Celsius verwahrt.

Die Gewinnung der genomischen DNA aus dem „buffy coat“ erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland).

Dabei wurden in einem 1,5 ml Schraubgefäß zu 200 µl des „buffy coats“ 20 µl der QIAGEN Proteinase-Lösung und 200 µl AL Puffer hinzugefügt. Die Mischung wurde für 15 Sekunden in einem Vortex-Gerät (Firma Bender & Hobein AG, Zürich) durchmischt. Anschließend wurde das Gefäß zur Lyse der Zellmembran für 10 Minuten bei 56° C im Wasserbad inkubiert.

Nun folgte die Zugabe von 200 µl 96 % Ethanol und ein erneutes Vermischen für 15 Sekunden. Die Probe wurde anschließend auf die vorgesehene Reinigungssäule übertragen und bei 6 000 upm für eine Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats folgte die Zugabe von 500 µl AW 1 Waschlösung auf die Säule und ein erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 6 000 upm. Auch dieses Filtrat wurde

wieder verworfen und danach 500 µl des AW 2 Waschpuffers auf die Säule übertragen. Anschließend wurde diesmal jedoch bei 20 000 upm für 3 Minuten zentrifugiert.

Im letzten Schritt löste man die nun gereinigte DNA mittels Zugabe von 200 µl AE Eluat Puffer und Zentrifugation bei 6 000 upm aus der Reinigungssäule. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die gereinigten DNA-Proben ebenfalls bei -20⁰ Grad eingefroren.

Nach dem langsamen Auftauen wurde die gereinigte DNA zur weiteren Verwendung mit H₂O_{bidest} im Verhältnis 1:100 verdünnt.

3.3 Charakterisierung der Chemokinrezeptor 5 (CCR 5) Allele

Der unter 1.2.3 beschriebene Polymorphismus stellt sich als Deletion von 32 Basenpaaren an der Aminosäurenstelle 185 im CCR5 Gen dar. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde ein 274 Basenpaar (bp) großes Fragment, welches die Δ 32 Deletion umschließt, amplifiziert. Bei Merkmalsträgern der Δ 32-Mutation besteht jedoch das Fragment nur aus 242 Basenpaare. Dies lässt sich mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar machen.

3.3.1 Amplifikation der DNA

Zur Amplifikation des unter 3.3 beschriebenen Fragments mittels PCR durch eine Taq Polymerase (HotStar-Taq DNA Polymerase, QUIAGEN, Hilden, Deutschland) wurden die Primer P 1 und P 2 verwendet (siehe Tabelle 3).

Primer	Sequenz
P1	5'-TTT-ACC-AGA-TCT-CAA-AAA-GAA-G-3'
P2	5'- GGA-GAA-GGA-CAA-TGT-TGT-AGG-3'

Tabelle 3: Primer P1 und P2 mit denen eine die Δ 32 Deletion enthaltene Sequenz amplifiziert wird

Die Sequenzen der Primer sind der Literatur entnommen [Mack et al., 1999] und bei TIB-Molbiol (Berlin) erhältlich. Wie oben schon erwähnt, rahmt die amplifizierte Sequenz die 32 bp-Deletion ein. Die beiden Primer wurden je mit einer Konzentration von 0,5 μ mol/l einem bestimmten Gemisch hinzugesetzt. Dieser Mix bestand aus:

- Nukleoidkonzentration dNTP (bestehend zu gleichen Teilen aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) von 200 μM
- Reaktions-Puffer (100 mM Tris-Cl, 500 mM $\text{KCl}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl_2 mit pH 8,7 bei 20°C (QUIAGEN, Hilden, Deutschland))
- Q-Solution in einfacher Endkonzentration
- 2,5 Units HotStar-Taq DNA Polymerase (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*

45 μl von diesem Master-Mix wurden mit 15 μl der unter Punkt 2.2 aufbereiteten und verdünnten DNA inkubiert und das Endgemisch bestand somit aus:

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	25,2 μl
dNTP	0,9 μl
Puffer	6 μl
Primer P 1	0,3 μl
Primer P 2	0,3 μl
HotStarTaq	0,3 μl
Q-Solution	<u>12 μl</u>
Master-Mix gesamt	45 μl
<u>DNA (1:100 Verd. mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$)</u>	<u>15 μl</u>
Gesamtvolumen	60 μl

Die nun folgende Polymerasekettenreaktion wurde in einem vollautomatischen Biometra-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zu Beginn für 15 Minuten auf 95°C vorheizen. Anschließend denaturieren der komplexen DNA bei 94°C für 45 Sekunden, um nach Abkühlung eine Anlagerung der Primer an ihre komplementären Sequenzen zu erreichen (Annealing). Dies geschieht innerhalb einer Minute bei 56°C. Die Polymerisation, in der eine Verlängerung der Primer stattfindet, dauert ebenfalls eine Minute bei einer Temperatur von 72°C.

Nun werden die Schritte von Denaturierung über Annealing zur Polymerisation in 35 Zyklen wiederholt (siehe Tabelle 4):

Denaturierung	94°C	45 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	56°C	60 Sekunden	
Polymerisation	72°C	60 Sekunden	

Tabelle 4: PCR-Protokoll

Nach dem letzten Zyklus erfolgt die Stabilisierung des Reaktionsprodukts über zehn Minuten bei 72°C.

3.3.2 Agarosegelelektrophorese

Das amplifizierte Reaktionsprodukt soll nun mittels eines Agarosegels sichtbar gemacht werden.

Dazu wurden 3 g Pulver NuSieve der Firma BioProducts (Rockland, USA) in 100 ml verdünntem TAE-Puffer aufgelöst. Nach 15 minütiger Einwirkzeit wurde das Gemisch in der Mikrowelle bei 600 Watt zwei Minuten erhitzt. Dann folgte nach 10 Minuten eine erneute Erwärmung bei 900 Watt für zwei Minuten.

Nach einer Abkühlzeit von einer Minute wurde der Lösung unter einem Luftabzug 3 µl Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}N_3Br$) hinzugefügt. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und somit die Fluoreszenz der Substanz durch Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im NuSieve-Gel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNA-Menge.

Die Lösung wurde dann in eine kleine Kammer eingebracht und für 20 - 30 Minuten abgekühlt. Nun wurden in ausgestanzten Taschen des verfestigten Gels 25 µl des Reaktionsprodukts und 2,5 µl Auftragspuffer gebracht. Danach wurde eine gleichmäßige Spannung von 100 Volt angelegt. Zur Zuordnung der Banden sind 20 und 123 Basenpaar (bp) große Leitern mitgelaufen.

Durch UV-Licht konnte dann das DNA-Fragment dargestellt und analysiert werden. Bei Patienten mit den Wildtypallelen kam nur eine 274 bp Bande zur Darstellung. Zwei Banden mit den Längen 274 und 242 zeigten sich bei den heterozygoten

Merkmalsträgern der $\Delta 32$ -Mutation. Und im Falle von homozygoten Merkmalsträgern fand man nur eine 242 bp Bande (Abbildung 1).

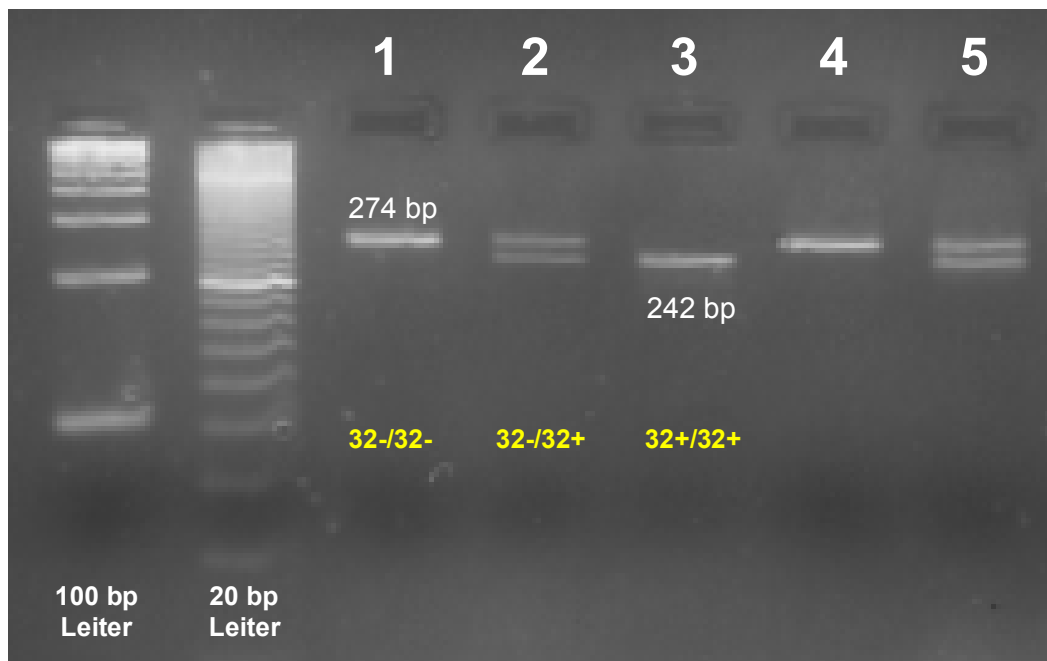


Abbildung 3: Gelelektrophorese zur Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente des CCR 5 Gens. An Stelle 1 stellt sich nur eine 274 Basenpaar (bp) lange Bande dar und zeigt somit einen Wildtyp ($\Delta 32$ -/ $\Delta 32$ -) an. An Stelle 2 sieht man sowohl eine 274 bp und 242 bp lange Bande. Beide Banden sind bei heterozygoten Merkmalsträgern ($\Delta 32$ -/ $\Delta 32$ +) zu beobachten. An Stelle 3 ist nur eine 242 bp lange Bande zu erkennen. Dies ist bei homozygoten Merkmalsträgern ($\Delta 32$ +/ $\Delta 32$ +) zu sehen. Stelle 4 zeigt wieder einen Wildtyp und Stelle 5 einen Heterozygoten.

3.4 Charakterisierung der -308 Tumor Nekrose Faktor (TNF) Allele

Der unter 1.3.3 beschriebene Polymorphismus ist ein „single nucleotide“ Polymorphismen (SNP) von G (TNF 1 Allel) zu A (TNF 2 Allel) an der Stelle -308 in der Promotorregion von TNF α . Mittels unterschiedlicher Primer wurde entweder das TNF 1 Allel bzw. das TNF 2 Allel amplifiziert. Diese Produkte lassen sich ebenfalls in der Gelelektrophorese darstellen.

3.4.1 Amplifikation der DNA

Der Primer C 1 wurde in Kombination mit dem Primer C 2 zur Amplifizierung des TNF 1 Allels mittels einer PCR verwendet. Für das TNF 2 Allel wurde wieder der Primer C 1, diesmal aber zusammen mit dem Primer C 3 gebraucht (Primer siehe Tabelle 5). Als interne Kontrolle diente das Primerpaar GAPHse und GAPHas, welches eine 310 bp lange Sequenz aus dem GAPDH Gen amplifiziert.

Primer	Sequenz
C1	5'-TCT-CGG-TTT-CTT-CTC-CAT-CG-3'
C2	5'-ATA-GGT-TTT-GAG-GGG-CAT-GG-3' (für TNF 1 Allel)
C3	5'-ATA-GGT-TTT-GAG-GGG-CAT-GA-3' (für TNF 2 Allel)

Tabelle 5: Primer C1 und C2 amplifizieren TNF 1; Primer C1 und C3 amplifizieren TNF 2

Die Sequenzen wurden 1994 von Verjans et al. beschrieben und sind kommerziell erhältlich. Sie wurden jeweils in einer Konzentration von 0,25 µmol/l einem Reaktionsgemisch hinzugefügt, welches sich zusammensetzt aus:

- Nukleoidkonzentration dNTP (bestehend zu gleichen Teilen aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) von 200 µM
- Reaktions-Puffer (100 mM Tris-Cl, 500 mM KCl(NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂ mit pH 8,7 bei 20°C (QUIAGEN, Hilden, Deutschland)
- 2,5 Units HotStar-Taq DNA Polymerase (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*
- Kontroll-Primerpaar GAPDHse und GAPDHas mit einer Konzentration von jeweils 0,25 µM/l

Es wurden wieder 45 µl dieser Lösung mit 15 µl der unter 2.2 beschriebenen DNA vermischt und setzte sich nun wie folgt zusammen:

H ₂ O _{bidest}	36,9 µl
dNTP	1,2 µl
Puffer	6 µl
Primer P 1	0,15 µl
Primer P 2	0,15 µl
Primer G 1	0,15 µl
Primer G 2	0,15 µl

HotStarTaq	<u>0,3</u> μ l
Master-Mix gesamt	45 μ l
<u>DNA (1:100 Verd. mit H₂O_{bidest})</u>	<u>15</u> μ l
Gesamtvolumen	60 μ l

Anschließend wurde wieder die Polymerasekettenreaktion in dem Biometra-Thermocycler durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

- 32 Zyklen
- Vorheizen 15 min 95 Grad
- Denaturierung 45 sec 94 Grad
- Annealing 60 sec bei 60 Grad
- Extension 60 sec bei 72 Grad
- Inkubation 10 min 72 Grad

3.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte diesmal mit einem 2 % Agarosegel der Firma SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland). Die Herstellung entspricht weitgehend dem unter dem Punkt 2.3.2 dargestellten NuSieve-Gel. Die Visualisierung erfolgte wieder unter ultraviolettem Licht. Dabei waren in jeder Probe die 310 Basenpaar Bande der Kontrolle zu sehen. Bei der Verwendung der Primer C 1 und C 2 und dem Vorliegen des TNF 1 Allels stellte sich zusätzlich eine 184 bp lange Bande dar. Lag jedoch das TNF 2 Allel vor,

hatte man keine zusätzliche Bande. Umgekehrt verhielt es sich bei der Verwendung der Primer C 1 und C 3, welche das TNF 2 Allel amplifizieren (siehe Abbildung 2).

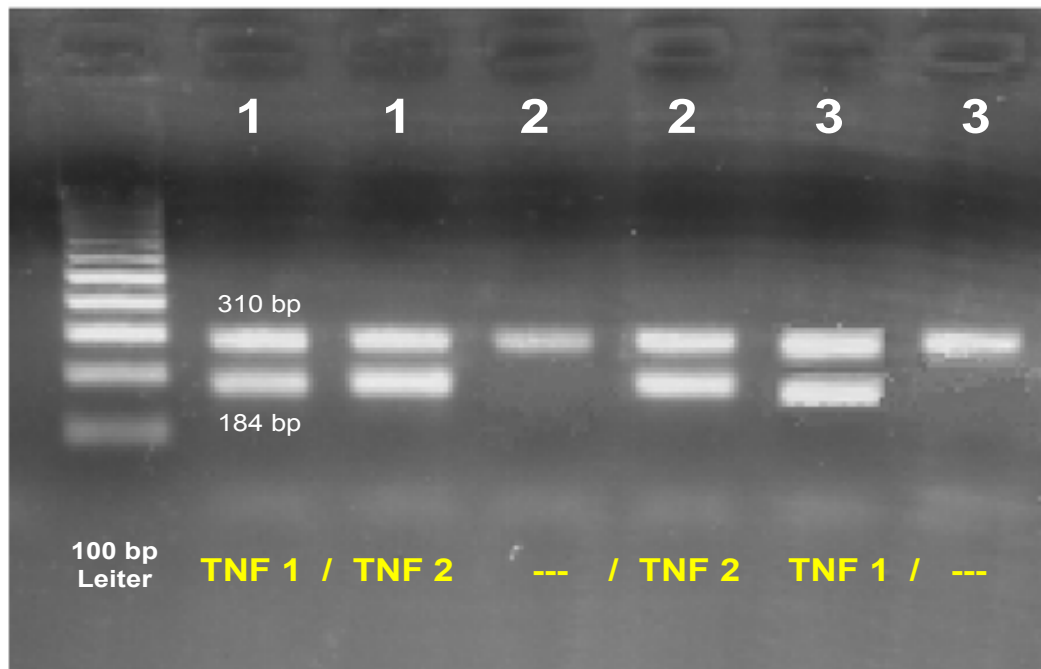


Abbildung 4: Gelelektrophorese zur Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente des TNF α Gens. In jeder Probe ist eine 310 bp lange Probe zur Kontrolle zu sehen. Bei Patient 1 stellt sich sowohl ein 184 bp lange Bande bei Verwendung der Primer C1 und C2 (TNF 1 Allel) und C1 und C3 (TNF 2 Allel) dar. Patient 1 ist somit ein heterozygoter Merkmalsträger (TNF 1/TNF 2). Bei Patient 2 stellt sich nur bei Verwendung der Primer C1 und C3 (TNF 2 Allel) die 184 bp lange Bande und damit eine homozygoter Merkmalsträger für das TNF 2 Allel dar. Patient 3 zeigt nur die 184 bp lange Bande mit den Primern C1 und C2 und demnach ein Wildtyp.

3.5 Statistische Auswertung

Die Daten des Ergebnisteils wurden mit Hilfe des Fischer's Exakt Test und des χ^2 -Tests bestimmt.

Desweiteren wurde folgende Software verwendet:

- Windows XP Professional Betriebssystem
- Word 2005
- Excel
- SPSS für Windows

4. Ergebnisse

4.1 Charakterista der Studienpopulation

Die klinischen und labortechnischen Charakteristika der unter Punkt 2.1 beschriebenen Patientenpopulation mit chronischer Hepatitis C und der Kontrollgruppe sind in Tabelle 6 dargestellt:

Kenndaten	HCV Patienten (n=62)	Kontrollgruppe (n=119)
Anzahl (männlich/weiblich)	28 / 34	49 / 70
Alter Mittelwert ± Standardabweichung: Bereich:	42 ± 11 20 - 61	39 ± 12 19 - 72
Viruslast Mittelwert ± Standardabweichung: Bereich:	2,46 ± 0,45 0,003 - 24	- -
S-ALT Mittelwert ± Standardabweichung: Bereich:	74 ± 45 32 - 222	- -
Genotypen 1 oder 4: 2 oder 3:	37 25	- -

Tabelle 6: Klinische und labortechnische Kenndaten

59 der 62 Patienten der Studie von Schaefer [Schaefer et al., 2003] beendeten die sechs Monate unter Therapie mit Interferon und Ribavirin und wurden somit in die Studie mit einbezogen.

4.2 CCR 5

4.2.1 Häufigkeitsverteilung der Chemokinrezeptor 5 Allele

Die Allelfrequenz für die $\Delta 32$ Mutation des Chemokinrezeptors 5 betrug bei den mit dem Hepatitis C Virus infizierten Patienten 13,7 % und bei der gesunden Kontrollgruppe 11,3 %. Eine signifikant erhöhte Frequenz der Mutation konnte somit bei HCV infizierten Patienten nicht festgestellt werden (siehe Tab. 7 und Diagr. 1).

Allel	HCV Patienten n (%)	Kontrollgruppe n (%)	p-Wert
CCR 5 $\Delta 32$ +	17 (13,7)	27 (11,3)	0,513
CCR 5 $\Delta 32$ -	107 (86,3)	211 (88,7)	

Tabelle 7: Allelfrequenz CCR 5

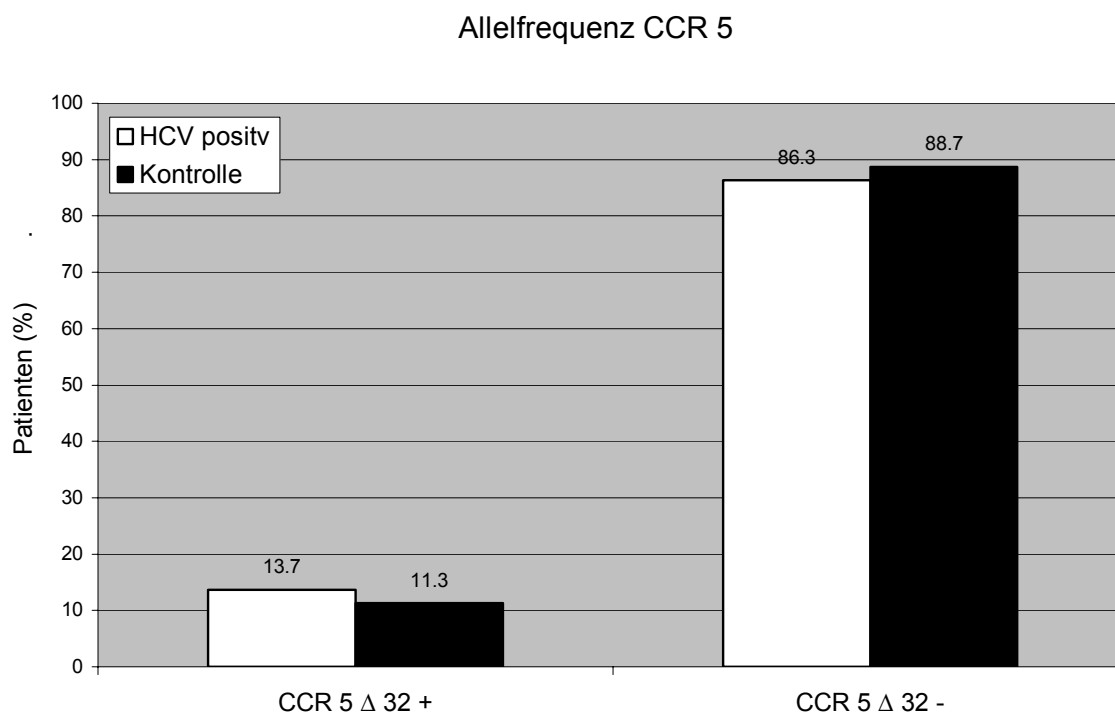


Diagramm 1: Allelfrequenzen CCR 5

4.2.2 Häufigkeitsverteilung der CCR 5 Genotypen

Sowohl in der HCV-positiven Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe gab es jeweils nur einen Homozygoten Genotyp.

Die meisten Teilnehmer beider Gruppen waren Wildtypen oder heterozygot für die $\Delta 32$ Mutation (siehe Tabelle 8 und Diagramm 2).

Genotyp	HCV Patienten n (%)	Kontrollgruppe n (%)	p-Wert
CCR 5 $\Delta 32 +/\Delta 32 +$	1 (1,6)	1 (0,8)	0,783
CCR 5 $\Delta 32 +/\Delta 32 -$	15 (24,2)	25 (21,0)	
CCR 5 $\Delta 32 - / \Delta 32 -$	46(74,2)	93(78,2)	

Tabelle 8: Genotyp Frequenz CCR 5

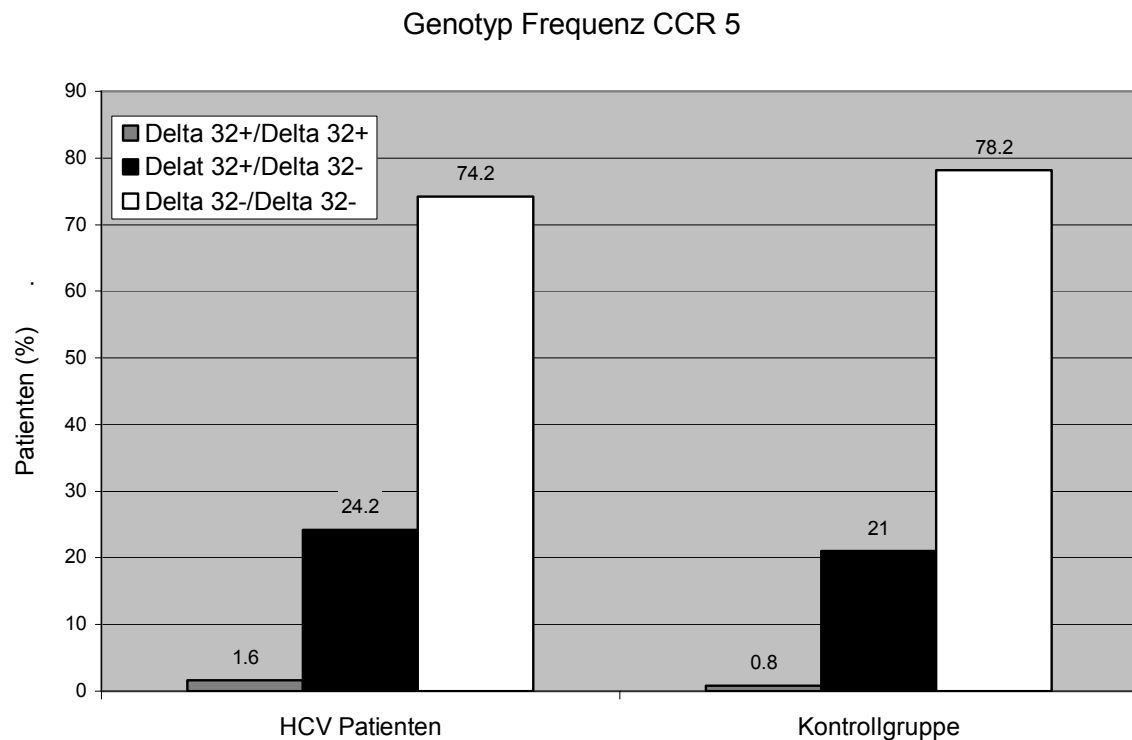


Diagramm 2: Genotyp Frequenz CCR 5

4.2.3 Korrelation zwischen CCR 5 Mutation und Therapieansprechen

Es wurden das Therapieansprechen der Patienten mit der $\Delta 32$ Mutation des CCR 5 Allels mit dem der Patienten mit Wildtyp verglichen. Ein Ansprechen der Therapie nach sechs Monaten wurde bei Normalisierung der Alanin-Aminotransferase (ALT) und eines negativen Nachweises der HCV-RNA definiert.

Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Ansprechen der Therapie mit Interferon und Ribavirin und der Präsenz der $\Delta 32$ Mutation (siehe Tabelle 9 und Diagramm 3) bei den 59 Patienten, welche die Studie beendet haben.

Allel	Responder n (%)	Nonresponder n (%)	p-Wert
CCR 5 $\Delta 32 +$	8 (13,5)	7 (11,9)	0,935
CCR 5 $\Delta 32 -$	24 (40,7)	20 (33,9)	

Tabelle 9: Therapieansprechen in Anlehnung an den CCR 5 $\Delta 32$ Polymorphismus; Homozygote für das Wildtyp Allel ($\Delta 32^-/\Delta 32^-$) sind klassifiziert als CCR 5 $\Delta 32 -$, Homozygote ($\Delta 32^+/\Delta 32^+$) und heterozygote ($\Delta 32^+/\Delta 32^-$) Träger wurden in der CCR 5 $\Delta 32 +$ Gruppe zusammengefasst.

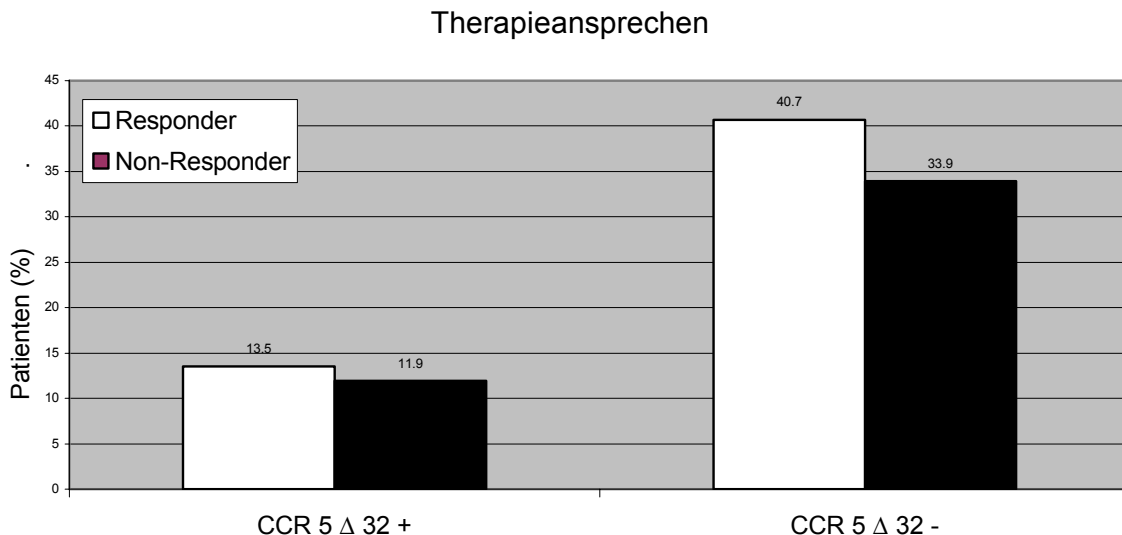


Diagramm 3: Therapieansprechen korreliert mit dem CCR 5 $\Delta 32$ Polymorphismus;

4.3 TNF α

4.3.1 Häufigkeitsverteilung des TNF α Allele

Bei den Hepatitis C infizierten Gruppe zeigte sich eine Frequenz für das TNF 2 (-308 A) Allel von 16,1 %. Bei der Kontrollgruppe lag sie bei 15,6 %.

Ein signifikanter Unterschied errechnete sich sonst nicht (siehe Tabelle 10 und Diagramm 4).

Allel	HCV Patienten n (%)	Kontrollgruppe n (%)	p-Wert
TNF 1 (-308 G)	104 (83,9)	201 (84,4)	0,885
TNF 2 (-308 A)	20 (16,1)	37 (15,6)	

Tabelle 7: Allelfrequenz TNF α -308

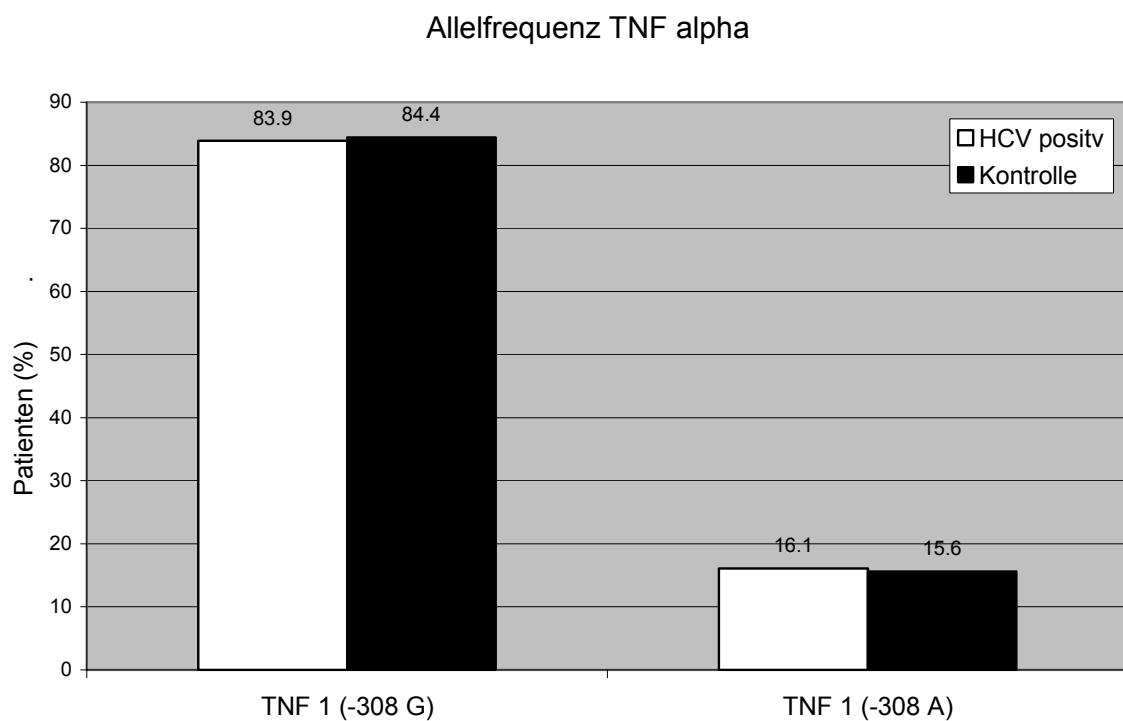


Diagramm 4: Allelfrequenz TNF α -308

4.3.2 Häufigkeitsverteilung der TNF α Genotypen

In der HCV Gruppe (2 von 62) und in der Kontrollgruppe (4 von 119) waren jeweils 3 % homozygot für das TNF2 Allel (TNF α -308 AA).

Die meisten Patienten und Kontrollen waren homozygot für das TNF 1 Allel (TNF α -308 GG). Die Heterozygoten (TNF α -308 GA) waren ebenfalls bei beiden Populationen prozentual nahezu gleich vertreten (26 vs. 24), wie aus der Tabelle 11 und dem Diagramm 5 ersichtlich ist.

Genotyp	HCV Patienten N (%)	Kontrollgruppe n (%)	p-Wert
TNF α -308 GG	44 (71)	86 (73)	0,977
TNF α -308 GA	16 (26)	29 (24)	
TNF α -308 AA	2 (3)	4 (3)	

Tabelle 11: Genotyp Frequenz TNF α

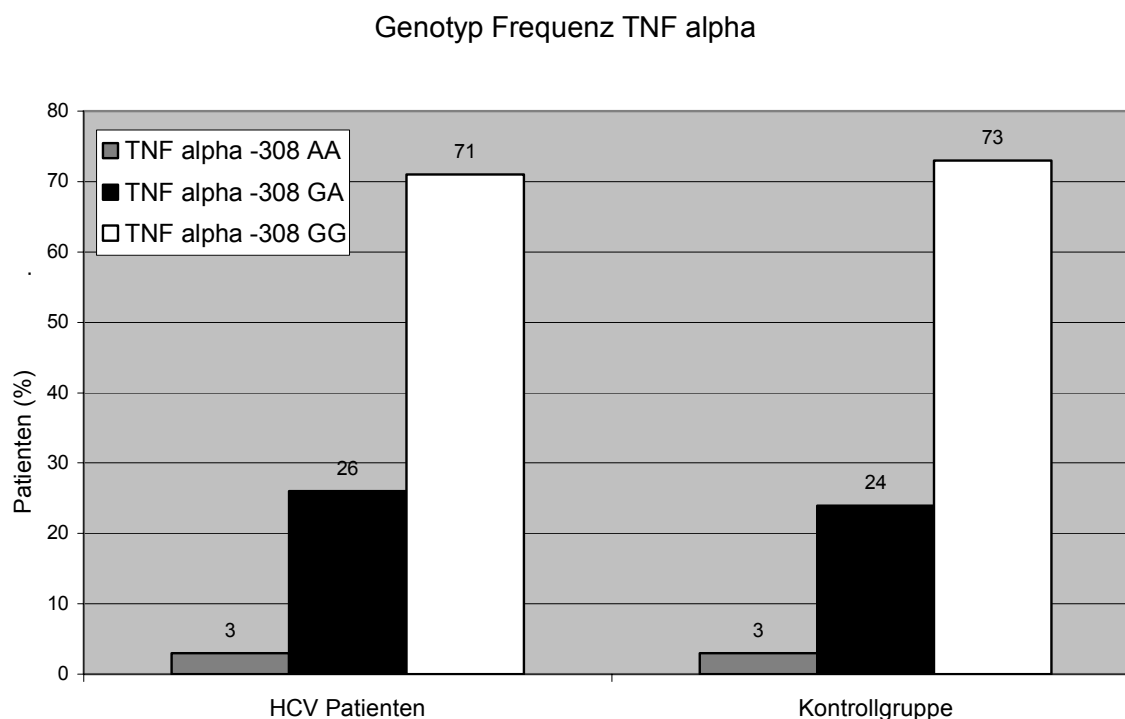


Diagramm 5: Genotyp Frequenz TNF α

4.3.3 Korrelation zwischen TNF α Mutation und Therapieansprechen

Wieder wurde das Therapieansprechen zwischen Patienten mit und ohne Mutation an Stelle -308 des TNF α Gens verglichen.

Auch hier zeigt sich mit der gleichen Anzahl auftretenden „single nucleotide“ Polymorphismen in beiden etwa gleich großen Gruppen kein signifikanter Unterschied (Tabelle 12 und Diagramm 6).

Allel	Responder n (%)	Nonresponder n (%)	p-Wert
TNF 1 (-308 G)	23 (39,0)	18 (30,5)	0,665
TNF 2 (-308 A)	9 (15,3)	9 (15,3)	

Tabelle 12: Therapieansprechen in Anlehnung an den TNF α -308 Polymorphismus; Homozygote für das Wildtyp Allel -308 GG sind klassifiziert als TNF 1, Homozygote -308 AA und heterozygote -308 GA Träger wurden in der TNF 2 – Gruppe zusammengefasst.

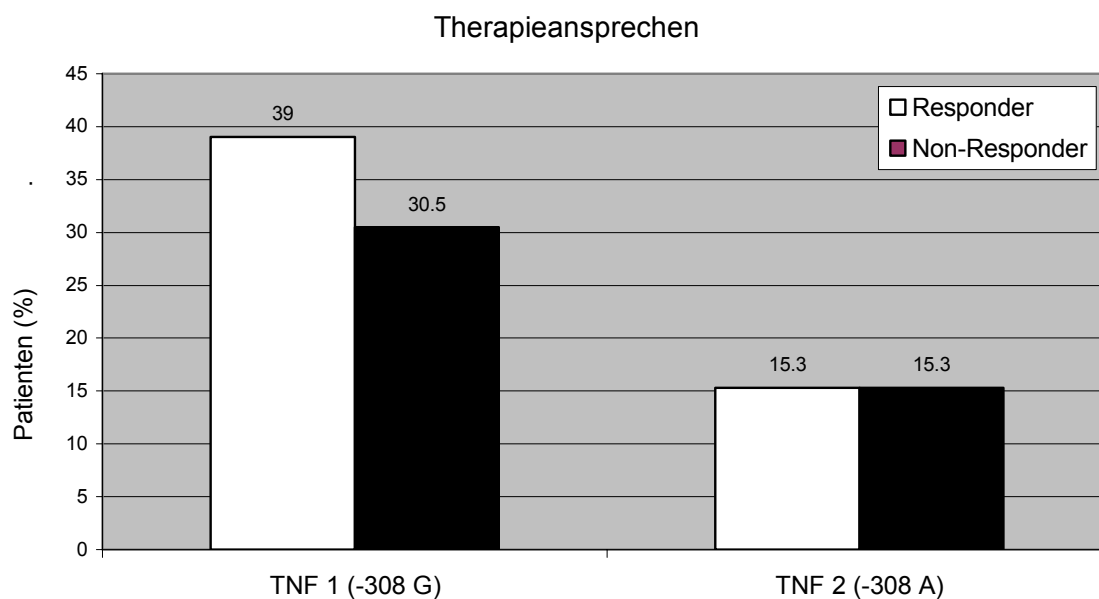


Diagramm 6: Therapieansprechen in Anlehnung an den TNF α -308 Polymorphismus

4.4 Korrelation zwischen Virus Genotyp und Therapie

Das Ansprechen der Hepatitis C Patienten auf die Therapie mit Interferon und Ribavirin in Korrelation zu den unterschiedlichen Virus Genotypen ist in der Tabelle 13 und dem Diagramm 7 dargestellt und entspricht dem Ergebnis vieler anderer Studien [Fried et al., 2002; Manns et al., 2001].

Virus Genotyp	Responder n (%)	Non-Responder n (%)	p-Wert
1 oder 4 (n=36)	15 (41,7)	21 (58,3)	0,15
2 oder 3 (n=23)	17 (73,9)	6 (26,1)	

Tabelle 13: Korrelation Virus Genotyp und Therapieansprechen

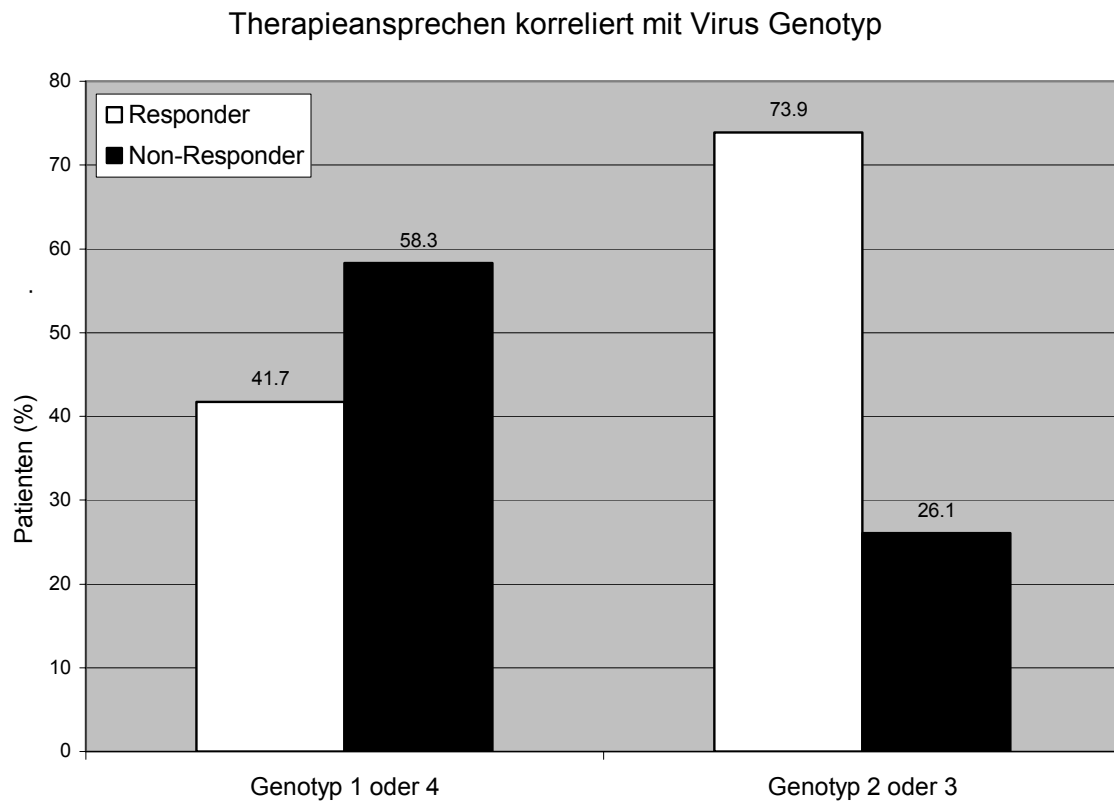


Diagramm 7: Korrelation Virus Genotyp und Therapieansprechen

4.5 Zusammenfassung Ergebnisse

4.5.1 Zusammenfassung Ergebnisse CCR 5

Bei den 62 HCV infizierten Patienten unserer Studie zeigte sich kein Unterschied sowohl in der Allelfrequenz als auch in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen von der Δ 32 Mutation des Chemokinrezeptors 5 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Bei den 59 der 62 Patienten, welche die sechs monatige Therapie mit Interferon und Ribavirin beendet hatten, zeigte sich auch keine Korrelation zwischen dem Ansprechen der Therapie und der Präsenz der Δ 32 Mutation. Eine Assoziation zwischen der CCR 5 Δ 32 Deletion und dem Verlauf sowie dem Therapieansprechen bei der chronischen Hepatitis C scheint es aufgrund unserer Ergebnisse nicht zu geben.

4.5.2 Zusammenfassung Ergebnisse TNF α

Auch bei dem TNF α -308 Polymorphismus konnte in der Häufigkeitsverteilung der TNF α Allele sowie Genotypen zwischen den 62 Patienten der Studie und der gesunden Kontrollgruppe kein Unterschied aufgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Therapieansprechen auf Interferon mit Ribavirin und dem Auftreten des Polymorphismus. Basierend auf unseren Ergebnissen konnte auch hier keine Assoziation zwischen der TNF α -308 Mutation und dem Verlauf sowie dem Therapieansprechen bei der chronischen Hepatitis C hergestellt werden.

Das Ansprechen unserer Patienten auf die Kombinationstherapie in Korrelation zu den Virus Genotypen entsprach dem Ergebnis vieler anderer Studien.

5. Diskussion

5.1 CCR 5

Wie in der Einleitung beschrieben, haben der CCR 5 Rezeptor und seine Liganden wichtige immunmodulatorische Eigenschaften, welche auch Auswirkungen auf die akute Hepatitis C und ihren spontanen und chronischen Verlauf sowie das Ansprechen auf die Therapie haben können. Aufgrund der Komplexität des Chemokinsystems mit der vielfältigen Bindungs- und Interaktionsmöglichkeiten der Chemokine sind die Auswirkung einzelner Polymorphismen jedoch pathophysiologisch in der Regel nur schwer oder kaum in Zusammenhang mit einer bestimmten Virusinfektion zu bringen.

Abgesehen von dem HIV Virus, welches den CCR 5 Rezeptor als Co-Rezeptor benutzt [Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Doranz et al., 1996], gibt es nur wenige Daten, die für eine Rolle des CCR 5 Rezeptors oder seiner $\Delta 32$ Mutation bei Virusinfektionen sprachen.

Das Hepatitis C Virus wird wie HIV parenteral übertragen und führt häufig zu einer chronischen Entzündung der Leber. Es benötigt im Gegensatz zu HIV jedoch nicht den CCR 5 Rezeptor zum Zelleintritt. Die CCR 5 Liganden MIP-1 α und MIP-1 β und RANTES sind alle Inhibitoren von viralen Infektionen [Raport et al., 1996; Qin et al., 1998]. Ein defekter CCR 5 Rezeptor könnte somit ein „immunologischer Nachteil“ in der Bekämpfung der HCV Infektion und ein bedeutender Schritt in Richtung Chronifizierung sein. Somit eignet sich das Hepatitis C Virus zur Untersuchung des Effektes einer veränderten CCR 5 Expression durch die $\Delta 32$ Deletion auf den Ablauf der Infektion und den Therapieausgang.

Woitats et al. postulierten 2002 einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Δ 32 Mutation von CCR 5 und der Hepatitis C Infektion. 385 weiße, anti-HCV und/oder anti-HIV positive Patienten wurden in drei Gruppen aufgeteilt (HCV Monoinfektion, HIV Monoinfektion und HCV/HIV Doppelinfektion). Keiner der HCV positiven Patienten hatte vor Studienbeginn eine Interferontherapie erhalten. Als Kontrollgruppe dienten 102 weiße Blutspender.

Es zeigte sich eine erhöhte Homozygotenfrequenz für die CCR 5 Δ 32 Deletion unter den HCV-positiven/HIV-negativen Patienten von 7,8 % (12 von 153) im Gegensatz zu 1 % in der gesunden Kontrollgruppe. Die Nummer der CCR 5 Δ 32 Homozygoten war damit 3 mal höher als erwartet. In den mit HIV infizierten Patientengruppen gab es erwartungsgemäß keine homozygoten Merkmalsträger. Ebenfalls war die Allelfrequenz der CCR 5 Δ 32 Mutation in der anti-HCV positiven Gruppe (16,0 %) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (8,3 %) und der HIV infizierten Gruppe (9,3 %). Desweiteren wurden bei den Homozygoten anti-HCV pos./anti-HIV neg. Patienten eine erhöhte Anzahl von CD 8+ T Zellen und erhöhte Viruslast im peripheren Blut gefunden (verglichen mit den heterozygoten und wildtyp Patienten der gleichen Gruppe).

Unterstützt werden die Ergebnisse von Nguyen et al. (1999), welcher von 119 HIV neg./HCV pos. Patienten mit Hämophilie 8 Homozygote für die Δ 32 Deletion entdeckte. Dies entspricht einem Anteil von 6,7 %. Ebenso fiel auf, dass diese acht dabei signifikant höhere Transaminasen als HCV-Patienten mit dem Wildtyp aufwiesen.

In unseren Untersuchungen war die Homozygotenfrequenz für die Δ 32 Mutation in der HCV Gruppe bei 1,6 % (1 von 62) und in der Kontrollgruppe bei 0,8 % (1 aus 119). Zwischen den beiden Gruppen gab es somit keinen signifikanten Unterschied und die Frequenz für CCR 5 Δ 32/ Δ 32 in beiden Gruppen stimmt mit den berichteten

Frequenzen in der Allgemeinbevölkerung [Samson et al., 1996; Dean et al., 1996] überein. Auch die Allelfrequenz für $\Delta 32$ zeigte keinen nennenswerten Unterschied zwischen HCV- (13,7 %) und Kontrollgruppe (11,3 %). Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den HCV Patienten mit oder ohne der $\Delta 32$ Mutation in Bezug auf Viruslast oder ALT Werte festgestellt werden.

Damit konnte das Ergebnis von Woitas nicht bestätigt werden und es stellt sich die Frage nach dem Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse.

Die Antwort ist vielleicht in den unterschiedlichen Studienpopulationen zu suchen. In Woitas Untersuchungen hatten die meisten der Patienten (83,7 %) in der anti-HCV pos./anti-HIV neg. Gruppe mit der erhöhten Homozygotenzahl eine Hämophilie. Die Patienten erhielten Faktor VIII und IX Konzentrate bevor diese auf HIV getestet wurden. Somit war ihr Risiko mit HIV infiziert zu werden zum damaligen Zeitpunkt deutlich erhöht. Eine Studie zeigte sogar, dass nur 6 % der Hämophiliepatienten, welche zwischen 1978 und 1985 mit Faktor VIII oder IX Konzentraten behandelt wurden, HIV-1 seronegativ waren [Kroner et al., 1994]. Bei HIV negativen Hämophiliepatienten erwartet man nun nach den Erkenntnissen der Resistenz gegen HIV bei $\Delta 32$ homozygoten Merkmalsträger eine erhöhte Frequenz der Mutation in dieser Gruppe. Dies zeigte sich auch mit einem erhöhten Anteil von 5,5 % (12 von 219) von $\Delta 32$ Homozygoten in der Multicenter Studie für Hämophiliepatienten von Nguyen [Nguyen et al., 1999]. Folglich spiegelt die erhöhte Prävalenz der CCR 5 $\Delta 32$ Homozygoten in der HCV pos./HIV neg. Gruppe der Hämophiliepatienten in Woitas Studie vielleicht eher die Resistenz gegenüber HIV als eine Anfälligkeit gegen eine HCV-Infektion wieder.

In unserer Studienpopulation war hingegen das wesentliche Risiko, an HCV zu erkranken, nicht eine Transfusion bei Hämophilie, sondern eine Infektion durch kontaminierte Nadeln bei intravenösem Drogenmissbrauch. Eine Selektion

hinsichtlich des Δ 32 CCR 5 Status durch eine koexistente HIV Infektion ist in unserer Untersuchung auszuschließen.

Desweiteren hatten in den beiden Studien von Woitas und Nguyen eine nicht unerhebliche Zahl von HCV positiven Patienten eine Koinfektion mit Hepatitis B. Dies stellt eine gute Erklärung für die erhöhte Viruslast und die höheren Transaminasen in den Voruntersuchungen dar.

In unserer untersuchten Gruppe war indessen eine Koinfektion mit HBV ebenso wie mit HIV ein Ausschlusskriterium. Weitere Patientencharakteristika sind unter Punkt 2.1 zu entnehmen.

Auch die Arbeitsgruppe um Promrat bestätigt unser Ergebnis. In ihrer Gruppe von 257 weißen HIV neg./HCV pos. Patienten waren 2 (0,8 %) homozygot für die Δ 32 Mutation. In der Kontrollgruppe waren es 26 von 2380 (1,1 %). Somit liegt auch hier die Homozygotenfrequenz im Bereich der Kontrollgruppe und der Normalbevölkerung. Die häufigste Infektionsquelle in Promrats HIV neg./HCV pos. Gruppe war intravenöser Drogenmissbrauch (39,5 %), gefolgt von Bluttransfusionen (22,4 %). Daneben ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen Δ 32 und Wildtyp Allelträgern in ALT-Werten, Viruslast, Grad der Leberentzündung sowie der Leberfibrose [Promrat et al., 2003].

In einer weiteren Studie [Dorak et al., 2002] zeigt sich ebenfalls eine ähnliche Verteilung der Δ 32 Homozygoten unter HCV infizierten Patienten. Unter den 250 weißen HIV neg./HCV pos. Patienten dieser Studie befand sich kein einziger Δ 32 Homozygoter. Die Frequenz der Δ 32 Mutation lag bei 8,4 %. Und damit wie in unserer Studie (13,7 %) im nordeuropäischen Durchschnitt von 8 – 16 % [Dean et al., 1996; Lu et al., 1999; Libert et al., 1998]. Ebenso wie in Promrats Untersuchungen waren die Hauptrisikofaktoren für eine HCV Infektion i.v. Drogenabusus und

Blutübertragungen. Auch hier konnten die $\Delta 32$ Allelträger mit einer erhöhten Viruslast in keinen Zusammenhang gebracht werden.

Desweiteren wurden in einer groß angelegten Studie in mehreren hepatologischen Kliniken in Europa zwischen 1995 und 2001 Hepatitis C Patienten auf unterschiedliche Polymorphismen untersucht [Hellier et al., 2003]. Auch in dieser Studie war das Ausschlußkriterium eine Koinfektion mit HBV oder HIV oder eine andere Lebererkrankung. Ebenso hier lag die Frequenz der $\Delta 32/\Delta 32$ Homozygoten unter den Patienten mit chronischer Hepatitis C bei 1,6 % und damit nahe dem erwarteten Bereich in der kaukasischen Gruppe.

Somit gibt es keine Hinweise, dass sich die in zwei Voruntersuchungen beschriebene erhöhte Homozygotenrate der $\Delta 32$ Mutation bei Hepatitis C Patienten mit Hämophilie auch in anderen Patientengruppen mit chronischer Hepatitis C findet. Wahrscheinlich kam es in den zwei Hämophiliegruppen durch die HIV Resistenz zu einer Selektion der $\Delta 32/\Delta 32$ Homozygoten in den HIV neg./HCV pos. Patientengruppen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CCR 5 $\Delta 32$ Homozygoten und der chronischen Hepatitis C Infektion ist damit nicht zu postulieren.

Basierend auf der Möglichkeit einer Interaktion zwischen dem $\Delta 32$ CCR 5 Polymorphismus und der HCV Infektion wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass die Mutation ein Auswirkung auf die Therapie mit Interferon alpha und Ribavirin haben könnte [Woitas et al., 2002]. Daher wurde in unserer Studie das Ansprechen der HCV Patienten auf eine Therapie mit Interferon α 2a und Ribavirin nach 6 Monaten mit dem Auftreten der $\Delta 32$ Mutation korreliert. Dabei ergab sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der $\Delta 32$ Allel Präsenz und dem Therapieansprechen (13,5 % Responder vs. 11,9 % Nonresponder).

Ebenso kommen Promrat und Dorak mit Kollegen zu demselben Ergebnis. Promrat untersuchte 6 Monate nach Beendigung der Therapie deren Ansprechen und korreliert es mit dem Auftreten der $\Delta 32$ Mutation, jedoch ohne eine Assoziation abzuleiten zu können. Auch in Doraks Arbeitsgruppe unterschied sich die Allelfrequenz zwischen Respondern und Non-Respondern (15,5 % vs. 18,0 %) nicht wesentlich.

Auch hier konnte folglich kein Zusammenhang zwischen Auftreten der CCR 5 $\Delta 32$ Mutation und dem Ansprechen der Therapie bei der chronischen Hepatitis C mit Interferon und Ribavirin festgestellt werden.

Jedoch müssten für genauere Aussagen in Bezug auf den Therapieerfolg größere Patientenkollektive mit einer ausreichenden Zahl an CCR 5 $\Delta 32$ Homozygoten untersucht werden.

<i>Studie</i>	<i>$\Delta 32+/\Delta 32+$ erhöht</i>	<i>$\Delta 32$Allel- frequenz erhöht</i>	<i>Laborpara- meter bei Homozygoten</i>	<i>Assoziation m. Therapie- ansprechen</i>	<i>Patienten- kollektiv</i>
Woitas et al., 2002	+	+	Viruslast erhöht	k. Aussage	Hämophilie- patienten
Nguyen et al., 1999	+	-	Transamin- asen erhöht	k. Aussage	Hämophilie- patienten
Promrat et al., 2003	-	-	-	-	- Drogenab. - Bluttransf.
Dorak et al., 2002	-	-	-	-	- Drogenab. - Bluttransf.
Hellier et al., 2003	-	-	k. Aussage	k. Aussage	verschied. hepatol. KH
eigene Untersuchung	-	-	-	-	- Drogenab. - Psychatrie

Tabelle 14: Studienübersicht für CCR 5

Ein weiterer Aspekt in der Untersuchung des CCR 5 Polymorphismus in Bezug auf HCV ist, dass die Sekretion der Chemokine RANTES und MIP-1 α weitgehend auf die Portalfelder beschränkt ist und somit CCR 5 exprimierende TH 1 Zellen dorthin migrieren [Shields et al., 1999; Bonecchi et al., 1998]. Eine Entzündungsreaktion in den Portalfeldern ist das überwiegende Muster, welches sich bei einer chronischen HCV Infektion darstellt. Die Gruppe um Hellier entdeckte eine signifikante Assoziation zwischen $-\Delta 32/-\Delta 32$ Homozygoten und einer milden portalen Entzündungsreaktion [Hellier et al., 2003]. In diesem Modell, in dem durch einen defekten CCR 5 Rezeptor es zu einer geringeren Entzündungsreaktion in dieser Region kommt, wäre es dann möglich, wenn weniger Entzündungszellen in das Pfortadergebiet rekrutiert werden, dass mehr Zellen für die Entzündung in den Leberlobuli zur Verfügung stehen. Eine Entzündung in den Portalfeldern steht in diesem Modell dabei für eine benignere und eine lobuläre Entzündung für eine schwerwiegendere Form der Fibrose.

In unserer Studie wurde jedoch bei nur wenigen Patienten eine Leberbiopsie durchgeführt und daher können darüber keine Aussagen getroffen werden.

Ein geeignetes Modell zur Untersuchung weiterer Zusammenhänge des komplexen Chemokinsystem und ihrer Polymorphismen sind dabei die CCR 5 $-/-$ CCR 5 $-/-$ Knockout-Mäuse. An diesen wurde die Infektion mit dem lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) untersucht. Das LCMV bietet eine Analogie zu HCV hinsichtlich Beseitigung der Viren und immunvermittelter Erkrankung. Wie bei einer HCV Infektion, kommt es zu einer Ansammlung von CCR 5 exprimierenden CD 8 $+$ T Zellen und Makrophagen während der initialen Virusbekämpfung und der nachfolgenden Immunpathologie [Nansen et al., 2002]. Quantitative und qualitative Analysen von Entzündungsgewebe an LCMV infizierten Mäusen erbrachte jedoch

keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und CCR 5 -/CCR 5 - Knockout Mäusen.

Abschließend scheint es aufgrund unserer Ergebnisse keine Assoziation zwischen der Δ 32 Deletion des CCR 5 Rezeptors und dem Verlauf der chronischen Hepatitis C und deren Ansprechen auf die Kombinationstherapie mit Interferon und Ribavirin zu geben. Ganz im Gegensatz zu der HIV Infektion, wo ein, zum Zelleintritt benötigter, defekter CCR 5 Rezeptor einen gewissen Schutz darstellt.

Dennoch sollten in Bezug auf die unterschiedlichen Aussagen der Rolle des CCR 5 Δ 32 Polymorphismus im Krankheitsbild und Therapie der chronischen Hepatitis C in der Literatur weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei müssten vor allem große Patientenkollektive akquiriert werden, um eine ausreichende Zahl von Δ 32 CCR 5 Homozygoten untersuchen zu können.

5.2 TNF α

Der Tumor Nekrose Faktor α ist wie anfangs beschrieben ein bedeutender Mediator in verschiedensten Prozessen des Immunsystems und hat, wie in der Einleitung beschrieben, starken Einfluss auf die unterschiedlichsten Krankheitsverläufe.

Die Induktion des TNF α Gens durch Virusinfektionen (z.B. Coxsackievirus, Influenza A Virus oder Epstein-Barr-Virus) wurde in verschiedenen in vitro Modellen bewiesen [Rubin, 1992; Henke et al., 1992; Gong et al., 1991; Gosselin et al., 1992].

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass es auch bei chronischen Virushepatitiden zu einer vermehrten Produktion von Tumor Nekrose Faktor α nicht nur in den Zellen des Immunsystems, sondern ebenfalls in den Hepatozyten kommt [Gonzalez-Amaro et al., 1994]. Diese Sekretion von TNF α durch die Hepatozyten könnte ein Verteidigungsprogramm der Zelle durch Aktivierung benachbarter Leukozyten und Makrophagen sein [Becker et al., 1991]. Ferner könnte TNF α in virusbefallenen Zellen die Apoptose induzieren, um die Ausbreitung der Infektion zu verhindern [Shinagawa et al., 1991]. Der exakte pathogenetische Mechanismus, welcher durch überschüssige Aktivierung des Immunsystems zur Schädigung des Leberparenchyms führt, ist noch nicht genau bekannt [Lau, 1994].

Bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C wurden von Larrea et al. (1996) erhöhte Serumwerte von TNF α und eine gesteigerte Transkriptionsrate des TNF α Gens in der Leber im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe gemessen. Ebenso zeigte sich in einer anderen Arbeitsgruppe [Nelson et al., 1997], dass neben den erhöhten TNF α Werten auch vermehrt lösliche TNF-Rezeptoren im Serum bei HCV Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auftraten. Weitere Studien bestätigen die Aktivierung des TNF α Systems bei einer chronischen Infektion mit

dem Hepatitis C Virus [Taliani et al., 2002; Kallinowski et al., 1998; Tilg et al., 1992; Torre et al., 1994].

Desweiteren wurden jedoch bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Korrelationen zwischen der Höhe der TNF α Werte und Ausbildung einer Leberzirrhose [Dumoulin et al., 2001], der Höhe der Viruslast [Larrea et al., 1996; Dumoulin et al., 2001] und der intrahepatischen Entzündungsaktivität (portal und periportal) [Nelson et al., 1997] sowie der Höhe der Leberenzymwerte [Taliani et al., 2002; Nelson et al., 1997] postuliert. Die Korrelation zwischen den Höhen der Werte von TNF α und HCV RNA konnten jedoch von Nelson et al., 1997 nicht bestätigt werden. Ebenso erkannten Larrea et al., 1996 keinen Zusammenhang zwischen der Entzündungsaktivität in der Leber und der Höhe der TNF α Expression.

Unstrittig ist jedoch, dass es zu einer Aktivierung des TNF α Systems bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C kommt. Da der TNF α -308 A (TNF 2) Polymorphismus zu einer erhöhten Transkriptionsrate führt [Braun et al., 1996; Wu et McClain, 1997; Wilson et al., 1997; Kroeger et al., 1997], stellt sich die Frage nach dem Einfluss dieses Polymorphismus auf das Auftreten, den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen bei der chronischen Hepatitis C Infektion.

Die Arbeitsgruppe von T. Höhler [Höhler et al., 1998] untersuchte das Auftreten des TNF -308 Polymorphismus bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. Es zeigte sich ein Auftreten der Allelfrequenz für TNF -308 A in der Patientengruppe von 17,7 % (29 von 164) im Vergleich zu 16,2 % (32 von 198) in einer gesunden Kontrollgruppe. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Auch der Vergleich der Homozygotenfrequenz für TNF -308 A mit 4 % in der HCV Gruppe zu 6 % in der Kontrollgruppe sowie der

Heterozygotenfrequenz mit 28 % bei Hepatitis C Patienten zu 20 % in der Kontrolle zeigte keine signifikante Divergenz.

Auch unsere Untersuchungen unterstützen dieses Ergebnis. 16,1 % (20 von 124) der Patienten mit Hepatitis C wiesen das TNF α -308 A Allel auf im Vergleich zu 15,5 % (37 von 238) in der gesunden Kontrollgruppe. Die Homozygotenfrequenz für TNF α -308 war mit 3 % in beiden Gruppen identisch. Ebenso war die Heterozygotenfrequenz mit 24 % in der HCV-Gruppe zu 26 % in der Kontrollgruppe nahezu gleich.

Es konnte somit kein unterschiedliches Auftreten des TNF α -308 A Polymorphismus bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden werden.

Dies wird ebenfalls durch die Studien von Rosen [Rosen et al., 2002] bestätigt. Das Auftreten von TNF α -308 Polymorphismus Heterozygoten war mit 24 % und der Homozygoten mit 2 % in der HCV und der Kontrollgruppe gleich; und entspricht sonst den Werten unserer wie auch Höhlers Studienergebnisse.

Dennoch wird indirekt die Rolle von TNF α als proinflammatorisches Zytokin durch eine Studie mit IL (Interleukin) 10 an HCV Patienten unterstrichen. Bei diesen Patienten, bei denen eine Interferontherapie nicht anschluss, zeigten sich nach 12 wöchiger Therapie mit IL 10 eine signifikante Reduktion von TNF α Werten und Transaminasen im Serum sowie eine Besserung der Leberhistologie [Nelson et al., 2000]. Ebenfalls konnten Assoziationen zwischen bestimmten Interleukin 10 Polymorphismen und dem Verlauf und Therapieausgang bei der chronischen Hepatitis C beobachtet werden [Knapp et al., 2003]. TNF α ist ein Gegenspieler von Interleukin 10, welches als antiinflammatorisches Zytokin angesehen werden kann.

Desweiteren wurden bei HCV Patienten vor Therapiebeginn die TNF α Werte im Serum gemessen und mit dem Ausgang der Therapie verglichen. Dabei ergaben sich bei Patienten, bei welchen die Therapie ansprach, vor Therapiebeginn niedrigere TNF α Werte im Serum, unabhängig ob eine Monotherapie mit Interferon oder eine Kombinationstherapie mit Ribavirin durchgeführt wurde [Larrea et al., 1996; Neuman et al., 2001].

Diese Beobachtungen werfen somit die Frage auf, ob TNF α Polymorphismen nicht auch eine Auswirkung auf den Therapieverlauf bei HCV Patienten haben könnten.

Daher haben wir in unserer Untersuchung das Auftreten des TNF α -308 A Polymorphismus mit dem Anschlagen der Therapie mit Interferon α und Ribavirin nach 6 Monaten bei unseren HCV Patienten korreliert.

Es zeigte sich jedoch, dass unter den Trägern des -308 A Allels die Zahl der Responder mit denen der Nonrespondern identisch waren. Somit gibt es keinen Anhalt für einen Einfluß des TNF α -308 A Polymorphismus auf den Verlauf der Therapie mit Interferon und Ribavirin.

Ebenso zeigte sich in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Yee [Yee et al., 2001] keine Assoziation zwischen dem TNF α -308 A Polymorphismus und dem Anschlagen der HCV Therapie. Dort hatten 9 % der Responder und 17% der Nonresponder das -308 A Allel. Ferner stehen unsere Befunde im Einklang mit den Beobachtungen von Rosen [Rosen et al., 2002]. Er berichtet von einem Vorkommen des TNF -308 A Allels bei Respondern und Nonrespondern von 26 %. Auch hier zeigte sich bei weiterer Unterteilung keine Assoziation zwischen Virus Genotyp und Polymorphismus.

Folglich ist es nach der derzeitigen Datenlage unwahrscheinlich, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Therapieausgang bei der chronischen Hepatitis C und dem TNF α -308 A Polymorphismus gibt.

<i>Studie</i>	<i>TNF α -308 AA erhöht</i>	<i>TNF α -308 A Allelfrequenz erhöht</i>	<i>Assoziation mit Therapieansprechen</i>	<i>TNF α -238 A Allelfrequenz erhöht</i>
Höhler et al., 1998	–	–	k. Aussage	+
Rosen et al., 2002	–	–	–	+
Yee et al., 2001	–	–	–	k. Aussage
eigene Untersuchung	–	–	–	k. Aussage

Tabelle 15: Studienübersicht für TNF α

Dem gegenüber steht der TNF α -238 Polymorphismus. Höhler [Höhler et al., 1998] fand, dass die Frequenz des TNF α -238 A Allels signifikant höher in der Gruppe mit chronischer Hepatitis C (18,7 %) war als in der Kontrollgruppe (3,5 %). Somit könnte dieser Polymorphismus als ein Faktor zur Ausbildung einer chronisch aktiven Hepatitis C mitwirken.

Auch Rosen [Rosen et al., 2002] untersuchte das TNF -238 A Allel und seine Auswirkungen auf die Hepatitis C Therapie. Er entdeckte ebenfalls eine Trend zu einer höheren Frequenz (12 % vs. 4 %) des TNF α -238 A Allels unter HCV infizierten Patienten. Dieses war jedoch nicht signifikant.

In den beiden Studien von Rosen und Höhler zeigte sich allerdings keine Assoziation zwischen dem TNF α -238 Polymorphismus und dem Therapieverlauf der HCV

infizierten Patienten. Ebenfalls konnte kein Zusammenhang zwischen diesem oder dem TNF α -308 Polymorphismus und dem histologischen Schweregrad der Infektion gemacht werden.

Darüber hinaus scheinen jedoch andere Gene, z. B. für den Transforming Growth Factor (TGF) β , eine Verbindung zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis C und Resistenz gegenüber der kombinierten antiviralen Therapie aufzuweisen [Tokushige et al., 2003; Vidigal et al., 2002].

Abschließend kann festgehalten werden, dass der TNF α -308 A Polymorphismus weder einen Einfluss auf die Ausbildung einer chronischen Hepatitis C, noch auf den Verlauf und Ausgang der Kombinationstherapie mittels Interferon und Ribavirin zu haben scheint. Um jedoch eine definitive Aussage darüber zu machen, müssen Untersuchungen mit viel größeren Patientenzahlen durchgeführt werden. Nur so können Schlussfolgerungen über die TNF α -308 A Homozygoten getroffen werden.

6. Zusammenfassung

Die Infektion mit dem weltweit vorkommenden Hepatitis C Virus führt in über 90 % der Fälle zu einer chronischen Hepatitis. Diese kann zu einer Leberzirrhose und einem hepatozellulären Karzinom führen. Der dabei leberzellschädigende, pathogenetische Mechanismus ist nur unzureichend untersucht. Bestimmte Faktoren wie z.B. Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum scheinen einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion zu haben. Ebenso wirken auf das Ansprechen der Therapie andere Faktoren, wie z.B. der Virus-Genotyp, ein. Jedoch ist über die Auswirkungen des Immunsystems mit seinen genetischen Varianten auf den Krankheits- und Therapieverlauf bisher wenig bekannt.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten der $\Delta 32$ CCR 5 und der TNF α -308 Polymorphismus mit dem Auftreten bei einer chronischen Hepatitis C und dem Ansprechen auf die Therapie korreliert werden:

Der $\Delta 32$ CCR 5 Polymorphismus, welcher einen Einfluss auf die Infektion mit bestimmten HIV 1 Stämmen hat, zeigte in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation mit der chronischen Hepatitis C Infektion. Ebenso fanden wir keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des $\Delta 32$ CCR 5 Allels und dem Ansprechen auf die Kombinationstherapie mit Interferon- α -2a und Ribavirin.

In der Literatur finden sich zum Teil Studien, welche ein höheres Auftreten des $\Delta 32$ CCR 5 Allels bei Hämophiliepatienten postulieren, welche aufgrund einer Blutübertragung mit dem Hepatitis C Virus infiziert waren. Bei genauerer Analyse scheint dies jedoch eher eine Selektion aufgrund einer Resistenz gegenüber HIV bei HCV pos./HIV neg. Patienten mit Hämophilie wiederzuspiegeln.

Demgegenüber bestätigen andere Arbeitsgruppen, die nicht nur Hämophiliepatienten untersuchten, unsere Ergebnisse. Ebenso wurde betreffend der Assoziation des Δ 32 CCR 5 Polymorphismus und dem Ansprechen der HCV Therapie in unterschiedlichen Studien auch kein Zusammenhang festgestellt.

Bei dem untersuchten funktionell relevanten TNF α -308 Polymorphismus zeigte sich in der vorliegenden Studie ebenfalls kein verändertes Auftreten bei HCV infizierten Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Wiederum konnten wir keine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und dem Therapieausgang der chronischen Hepatitis C herstellen.

Diese beiden Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von anderen Forschungsgruppen.

Zusammenfassend ist es nach den Resultaten dieser Studie und der derzeitigen Datenlage unwahrscheinlich, dass eine Assoziation zwischen dem Auftreten der beiden Polymorphismen, Δ 32 CCR 5 und TNF -308, und der chronischen Hepatitis C Infektion bzw. deren Ansprechen auf die Therapie mit Interferon – α -2a und Ribavirin existiert. Demgegenüber stehend scheinen jedoch andere Polymorphismen von immunologisch relevanten Genen, wie z.B. Transforming Growth Factor (TGF) β , eine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf und den Therapieausgang der chronischen Hepatitis C zu haben. Daher sollten weitere, insbesondere auch über genetische Assoziationsstudien hinausgehende Untersuchungen vorgenommen werden, um die genauen pathogenetischen Vorgänge des Immunsystems im Laufe einer chronischen HCV Infektion zu analysieren. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte dann vielleicht der langfristige klinische Erfolg der Hepatitistherapie durch neue, spezifischere, also auf den genetischen Hintergrund der Patienten abgestimmte

Medikamente verbessert werden. Ebenso könnten basierend auf diesem Hintergrund die Therapiedauer und die kummulative Medikamentendosis individuell bestimmt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med.* 1992 Nov 19;327(21):1490-5.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.
- Arias AI, Giles B, Eiermann TH, Sterry W, Pandey JP. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14(2):118-22.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705.
- Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol.* 1991 Dec 15;147(12):4307-12.
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):30603-6.
- Bernal W, Moloney M, Underhill J, Donaldson PT. Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 1999 Feb;30(2):237-41.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F.; Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1998; 187 (1):129-134.

- Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster JR, Kuo G, Bonino F, et al. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology*. 1993 Feb;104(2):580-7.
- Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1996 Mar;103(3):391-6.
- Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett*. 1996 Sep 6;215(2):75-8.
- Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailish E, Moore MW. Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1825-32.
- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1259-64.
- Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien SJ, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am J Hum Genet*. 1997 Dec;61(6):1261-7.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1135-48.

- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.
- Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OS, Jennings R, Mbena E, Mabey DC. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter and with elevated TNF-alpha levels in tear fluid. *Infect Immun*. 1997 Mar;65(3):1003-6.
- Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999 Dec 10;286(5447):2098-102. Review.
- D'Alfonso S, Richiardi PM. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene. *Immunogenetics*. 1996;44(4):321-2.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996 Sep 27;273(5283):1856-62. Erratum in: *Science* 1996 Nov 15;274(5290):1069.
- Demeter J, Porzsolt F, Ramisch S, Schmidt D, Schmid M, Messer G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):107-12.

- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmor S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.
- Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K, Hoofnagle JH. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1995 Dec 15; 123(12):897-903.
- Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002 Nov; 36 (5 Suppl 1): S121-7. Review.
- Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1989 Nov 30;321(22):1506-10.
- Dorak MT, Folayan GO, Niwas S, van Leeuwen DJ, Yee LJ, Tang J, Kaslow RA. C-C chemokine receptor 2 and C-C chemokine receptor 5 genotypes in patients treated for chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):167-75.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1149-58.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):667-73.

- Dumoulin FL, Wennrich U, Nischalke HD, Leifeld L, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Intrahepatic mRNA levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and response to antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hum Virol.* 2001 Jul-Aug;4(4):195-9.
- EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol.* 1999; 31 Suppl 1:3-8. Review.
- Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem.* 1989 Oct 15;264(29):17595-605.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):224-30.
- Fan FS, Tzeng CH, Hsiao KI, Hu ST, Liu WT, Chen PM. Withdrawal of immunosuppressive therapy in allogeneic bone marrow transplantation reactivates chronic viral hepatitis C. *Bone Marrow Transplant.* 1991 Nov;8(5):417-20.
- Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1996 Aug 29;335(9):631-4.
- Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell.* 1996 Dec 13;87(6):1037-47.

- Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1;139(5):1349-60.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Haussinger 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 Sep 26;347(13):975-82.
- Friedrich-Rust M, Zeuzem S, Sarrazin C. Current therapy for hepatitis C. *Int. J. Colorectal Dis.* 2007 Apr;22(4):341-9. Epub 2005 Sep 21.
- Galbraith GM, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene polymorphism in alopecia areata. *Hum Genet.* 1995 Oct;96(4):433-6.
- Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, Volck B, Svejgaard A, Andersen V. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1998 Aug;25(8):1462-5.
- Gong JH, Sprenger H, Hinder F, Bender A, Schmidt A, Horch S, Nain M, Gemsa D. Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J Immunol.* 1991 Nov 15;147(10):3507-13.
- Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, Lopez-Cabrera M, Fernandez-Ruiz E, Sanchez-Madrid F. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):841-8.
- Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Stefanescu I, Ablashi DV, Gallo RC, Menezes J. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex,

- and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *J Immunol.* 1992 Jul 1;149(1):181-7.
- Gruber A, Lundberg LG, Bjorkholm M. Reactivation of chronic hepatitis C after withdrawal of immunosuppressive therapy. *J Intern Med.* 1993 Aug;234(2):223-5.
 - Gupta SK, Lysko PG, Pillarsetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):4282-7.
 - Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J, Horuk R. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):985-91.
 - Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004 Mar 2;140(5):346-55.
 - Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1;50(3):216-28.
 - Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet.* 1999 Oct 9;354(9186):1264-5.

- He B, Navikas V, Lundahl J, Soderstrom M, Hillert J. Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol.* 1995 Dec 31;63(2):143-7.
- He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):645-9.
- Health Nio. National Institutes of Health Consensus Conference on Hepatitis C. Paris. 26-28 February 1999, Consensus Statement. *European Association for the Study of the Liver J Hepatol.* 1999;30:956-961
- Heintges T, Mohr L, Niederau C. [Epidemiology and clinical features of chronic viral hepatitis], *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1994 Oct 7;119(40):1365-70. Review.
- Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology.* 1997 Sep; 26(3):521-6. Review.
- Heller RA, Song K, Onasch MA, Fischer WH, Chang D, Ringold GM. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Aug; 87(16):6151-5.
- Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology.* 2003 Dec;38(6):1468-76.

- Henke A, Mohr C, Sprenger H, Graebner C, Stelzner A, Nain M, Gemsa D. Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes. *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2270-7.
- Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol.* 1998 Mar;54(3):173-7.
- Hoofnagle JH, di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med.* 1997 Jan 30;336(5):347-56. Review.
- Hoofnagle JH. Therapy of acute and chronic viral hepatitis. *Adv Intern Med.* 1994;39:241-75. Review.
- Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ, Peiper SC. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol.* 1997 Mar 15;158(6):2882-90.
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1996 Nov;2(11):1240-3.
- Huffnagle GB, McNeil LK, McDonald RA, Murphy JW, Toews GB, Maeda N, Kuziel WA. Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 1999 Nov 1;163(9):4642-6.
- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius

- JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997 Feb;72(2):149-53.
- Hurme M, Helminen M. Resistance to human cytomegalovirus infection may be influenced by genetic polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Scand J Infect Dis.* 1998;30(5):447-9.
 - Jones DE, Watt FE, Grove J, Newton JL, Daly AK, Gregory WL, Day CP, James OF, Bassendine MF. Tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1999 Feb;30(2):232-6.
 - Kallinowski B, Haseroth K, Marinos G, Hanck C, Stremmel W, Theilmann L, Singer MV, Rossol S. Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol.* 1998 Feb;111(2):269-77.
 - Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E, Li T, Hagiwara H, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 1994 Nov;20(5):1121-30.
 - Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AV, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics.* 2003 Sep;55(6):362-9. Epub 2003 Aug 26.
 - Kohno T, Brewer MT, Baker SL, Schwartz PE, King MW, Hale KK, Squires CH, Thompson RC, Vannice JL. A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8331-5.

- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 1997 Apr;34(5):391-9.
- Kroner BL, Rosenberg PS, Aledort LM, Alvord WG, Goedert JJ. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994 Mar;7(3):279-86.
- Lamprecht P, Schnabel A, Gross WL. [Hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic vasculitis. Physiopathology, diagnosis and therapy]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1998 May 15;123(20):637-42. Review.
- 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 Feb;23(2):210-7.
- Lau JY. Hepatitis C virus: from epidemiology and molecular virology to immunobiology. *Hepatology.* 1994 Sep;20(3):760-2.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001 Jul 5;345(1):41-52.
- 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 Oct;24(4):790-5.
- Leifeld L, Spengler U, Sauerbruch T. [Clinical aspects and diagnosis of hepatitis C] *Dtsch Med Wochenschr.* 2000 Dec 1;125(48):1471-4. Review.
- Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rua C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Guran S,

- Kucinskas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The *deltaccr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet.* 1998 Mar;7(3):399-406.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):367-77.
 - Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature.* 1998 Jan 22;391(6665):344-5.
 - Loke H, Bethell D, Day N, White NJ, Hill AVS. A TNF promoter variant, HLA and dengue in Vietnam. *Human Immunology* 1996; 47:680.
 - Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1998 Sep;113(3):401-6.
 - Louis E, Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkes M, Fanning G, Welsh K, Jewell D. Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1996 Nov;39(5):705-10.
 - Lu Y, Nerurkar VR, Dashwood WM, Woodward CL, Ablan S, Shikuma CM, Grandinetti A, Chang H, Nguyen HT, Wu Z, Yamamura Y, Boto WO, Merriwether A, Kurata T, Detels R, Yanagihara R. Genotype and allele frequency of a 32-base pair deletion mutation in the CCR5 gene in various

- ethnic groups: absence of mutation among Asians and Pacific Islanders. *Int J Infect Dis.* 1999 Summer;3(4):186-91.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9448-53.
 - Mack M, Bruhl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, Plachy J, Stangassinger M, Uhlig K, Schattenkirchner M, Schlondorff D. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 May;42(5):981-8.
 - Mackay, C.R. Chemokines: what chemokine is that? *Curr.Bio.* 1997. 7:R384-R386
 - Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M, Vinelli F, Scotto G, Bacca D, Annese M, Romano M, Zechini F, Sogari F, Spirito F, Andriulli A. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med.* 2005 Jun 23;352(25):2609-17.
 - Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 2001 Sep 22;358(9286):958-65.
 - Martin K, Heinzlmann M, Borchers R, Mack M, Loeschke K, Folwaczny C. Delta 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene in inflammatory bowel disease. *Clin Immunol.* 2001 Jan;98(1):18-22.

- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994 Oct 6;371(6497):508-10.
- 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. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998 Nov 19;339(21):1485-92.
- Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, Sheppard HW. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1997 Oct;3(10):1160-2.
- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*. 1999 Aug 11;282(6):561-8.
- Mitchell SA, Chapman RW. The management of primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis*. 1998 May;2(2):353-72, x.
- Mitchell TJ, Walley AJ, Pease JE, Venables PJ, Wiltshire S, Williams TJ, Cookson WO. Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. *Lancet*. 2000 Oct 28;356(9240):1491-2.
- Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):123-8.
- Moser, B., M. Loetscher, L. Piali and P. Loetscher.. Lymphocyte responses to chemokines. *Int. Rev. Immunol*. 1997 In press.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, International union of pharmacology. XXII.

- Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Mar;52(1):145-76. Review.
- Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):878-80.
 - Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996 Aug 15;382(6592):635-8.
 - Nansen A, Christensen JP, Andreasen SO, Bartholdy C, Christensen JE, Thomsen AR. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1237-45.
 - Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology.* 2000 Apr;118(4):655-60.
 - Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci.* 1997 Dec;42(12):2487-94.
 - Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, Akremi R, Shear NH, Asselah T, Ibrahim A, Boyer N, Martinot-Peignoux M, Jacobson-Brown P, Katz GG, Le Breton V, Le Guludec G, Suneja A, Marcellin P. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. *Clin Biochem.* 2001 May;34(3):173-82.
 - Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1998 Oct 2;282(5386):103-7.

- Nguyen GT, Carrington M, Beeler JA, Dean M, Aledort LM, Blatt PM, Cohen AR, DiMichele D, Eyster ME, Kessler CM, Konkle B, Leissinger C, Luban N, O'Brien SJ, Goedert JJ, O'Brien TR. Phenotypic expressions of CCR5-delta32/delta32 homozygosity. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Sep 1;22(1):75-82.
- Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3487-93.
- Onji M, Kikuchi T, Kumon I, Masumoto T, Nadano S, Kajino K, Horiike N, Ohta Y. Intrahepatic lymphocyte subpopulations and HLA class I antigen expression by hepatocytes in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology.* 1992 Aug;39(4):340-3.
- Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infect Dis.* 1990 Nov-Dec;12(6):1139-46. Review.
- Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology.* 1998 Jun;27(6):1700-2.
- Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):943-52.
- Petrek M, Drabek J, Kolek V, Zlamal J, Welsh KI, Bunce M, Weigl E, Du Bois R. CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with

- pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1000-3.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997 Mar 22;349(9055):825-32.
 - Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, Zarski JP. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology.* 1996 Oct;24(4):778-89.
 - 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 Oct 31;352(9138):1426-32.
 - Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2003 Feb;124(2):352-60. Erratum in: *Gastroenterology.* 2003 Apr;124(4):1168.
 - Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest.* 1998 Feb 15;101(4):746-54.
 - Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor

- (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17161-6.
- Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):7092-102.
 - Roggendorf M, Lu M, Meisel H, Riffelmann M, Schreier E, Viazov S. Rational use of diagnostic tools in hepatitis C. *J Hepatol.* 1996;24(2 Suppl):26-34. Review.
 - Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL, Zaman A, Taylor K, Chou S. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002 Mar;97(3):714-20.
 - Rubin BY. TNF and viruses: multiple interrelationships. *Immunol Ser.* 1992;56:331-40.
 - Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol.* 1999 Apr;154(4):1125-35.
 - Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998 Mar 16;187(6):875-83.
 - Samson M, Soularue P, Vassart G, Parmentier M. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-

- CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics*. 1996 Sep 15;36(3):522-6.
- Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int*. 1999 Jul;56(1):281-8.
 - Schaefer M, Schmidt F, Folwaczny C, Lorenz R, Martin G, Schindlbeck N, Heldwein W, Soyka M, Grunze H, Koenig A, Loeschke K. Adherence and mental side effects during hepatitis C treatment with interferon alfa and ribavirin in psychiatric risk groups. *Hepatology*. 2003 Feb;37(2):443-51.
 - Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2000 Jan 3;102(1):98-106.
 - Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, Bonnard AM, Rosmorduc O, Poupon RE, Poupon R. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology*. 1998 May;27(5):1435-40.
 - Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):6236-43.
 - Shinagawa T, Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Pathol*. 1991 Nov;165(3):247-53.
 - Shindo M, Di Bisceglie AM, Cheung L, Shih JW, Cristiano K, Feinstone SM, Hoofnagle JH. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-

- interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 1991 Nov 1;115(9):700-4.
- Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994. 76: 301-314
 - Strieter RM, Standiford TJ, Huffnagle GB, Colletti LM, Lukacs NW, Kunkel SL. "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol.* 1996 May 15;156(10):3583-6. Review.
 - Taliani G, Badolato MC, Nigro G, Biasin M, Boddi V, Pasquazzi C, Clerici M. Serum concentration of gammaGT is a surrogate marker of hepatic TNF-alpha mRNA expression in chronic hepatitis C. *Clin Immunol.* 2002 Dec;105(3):279-85.
 - Tanaka S, Takenaka K, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Hepatitis C virus replication is associated with expression of transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-II in cirrhotic livers. *Dig Dis Sci.* 1996 Jan;41(1):208-15.
 - 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 U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9292-6.
 - Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology.* 1992 Jul;103(1):264-74.
 - Tokushige K, Tsuchiya N, Hasegawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, Komatsu T, Hayashi N. Influence of TNF gene polymorphism and HLA-DRB1 haplotype in Japanese patients with chronic liver disease caused by HCV. *Am J Gastroenterol.* 2003 Jan;98(1):160-6.

- Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med.* 1995 Jun 1;332(22):1463-6.
- Torre D, Zeroli C, Giola M, Ferrario G, Fiori GP, Bonetta G, Tambini R. Serum levels of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *Clin Infect Dis.* 1994 Feb;18(2):194-8.
- Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY, Sheen IS, Yeh CT, Huang JH, Kuo GC, Liaw YF. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology.* 1998 Oct;115(4):954-65.
- Turner DM, Grant SC, Lamb WR, Brenchley PE, Dyer PA, Sinnott PJ, Hutchinson IV. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. *Transplantation.* 1995 Nov 27;60(10):1113-7.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52. Review.
- Verjans GM, Brinkman BM, Van Doornik CE, Kijlstra A, Verweij CL. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol.* 1994 Jul;97(1):45-7.
- Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol.* 2002 Feb;36(2):271-7.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.* 1991 Apr 25;266(12):7313-6.

- von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, Bergk A, Bernsmeier C, Haussinger D, Herrmann E, Zeuzem S. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):522-7.
- Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P, Moullet I, Dumontet C, Neidhardt-Berard EM, Coiffier B, Salles G. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *Br J Cancer*. 1998 Jun;77(12):2357-62.
- WHO. The world health report 1998. Life in the 21 st century – A vision for all. 1998.
- Wilson AG, Clay FE, Crane AM, Cork MJ, Duff GW. Comparative genetic association of human leukocyte antigen class II and tumor necrosis factor-alpha with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*. 1995 May;104(5):856-8.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3195-9.
- Woitas RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002 Jun;122(7):1721-8.
- Wu WS, McClain KL. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res*. 1997 Oct;17(10):631-5.

- Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology*. 2001 Mar;33(3):708-12.
- Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, Colucci G, Roth WK. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology*. 2001 May;120(6):1438-47.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol*. 2004 Jun;40(6):993-9. Erratum in: *J Hepatol*. 2005 Mar;42(3):434.
- Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol*. 1998 Apr 15;160(8):4018-25.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):595-9.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. C. Folwaczny für die Vergabe des interessanten Themas sowie die immerwährende, unkomplizierte Unterstützung und für seine Geduld bedanken.

Ebenfalls danke ich aufrichtig Herrn Priv. Doz. Dr. med. U. Schiemann und Herrn Dr. med. J. Glas für die kompetente Betreuung und Hilfestellung.

Mein besonderer Dank gilt Frau K. Martin, in memoriam, für ihre vorbildliche Einarbeitung und Bemühungen.

Desweiteren Frau Dr. med. H. Török ein herzliches Dankeschön für ihre permanente Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung. Ebenso danke ich allen Institutsmitarbeitern sowie Freunden und Bekannten, die an dem Zustandekommen dieser Arbeit mitwirkten.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern, Günter und Hermine Simperl, die mit uneingeschränkter, liebevoller Unterstützung meine Ausbildung ermöglichten. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter für das mühevoll Korrekturlesen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian G. Simperl
Zieblandstraße 41
80798 München

Geburtsdatum: 10.08.1976
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1983 – 07/1987 Grundschule Deggendorf
09/1987 – 06/1996 Robert-Koch-Gymnasium in Deggendorf, Abitur

Wehrdienst

07/1996 – 05/1997 Hochgebirgszug in Berchtesgaden mit Auslandsaufenthalt in den
U.S.A.

Studium

11/1997 Studium des Ingenieurwesens an der Technischen Universität
München
05/1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
(LMU) München
04/2000 Ärztliche Vorprüfung
04/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

Famulaturen:

08/2000	Unfallchirurgie im Klinikum Deggendorf
09/2001	Innere Medizin in der Medizinischen Klinik der LMU
03/2002	Dermatologie in der Dermatologischen Klinik der LMU
08/2002	Emergency Room im St.Clares Hospital, New York City, U.S.A.
09/2002	Orthopädie in der Praxisklinik Dr. med. Peter Schäferhoff, Köln

Praktisches Jahr:

04/2003	Gastroenterologie im Krankenhaus München Schwabing
06/2003	Kardiologie an der University of Wales, Cardiff
08/2003	Gefäßchirurgie an der Università degli Studi di Siena, Italien
12/2003	Ophthalmologie in der Augenklinik der LMU

Hospitation:

03/2004	Orthopädie in der Orthopädischen Klinik Harlaching
---------	--

Ärztliche Tätigkeit:

06/2004	Arzt im Praktikum in der Orthopädischen Abteilung im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München
seit 11/2004	Assistenzarzt in der Orthopädischen Abteilung im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München

München, Februar 2008