

Abschlussbericht Teilprojekt 10.1.3

Projekttitlel: Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Immun- und Therapieantwort mit Fokus auf der Interaktion von Toll-ähnlichen Rezeptoren bei chronischer Hepatitis C

Projektleiter: Prof. Dr. med. Thomas Berg
Charité Campus Virchow-Klinikum
Med. Klinik Gastroenterologie/Hepatology
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Telefon: +49 (0) 30 / 450553071

Fax: +49 (0) 30 / 450553903

E-Mail: thomas.berg@charite.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Die Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion ist von großer medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung. Die Behandlung einer HCV-Infektion ist langwierig und teuer und führt nur bei einem Teil der Infizierten zu einer dauerhaften Viruselimination. Eine protektive Impfung ist nicht möglich. Die chronische Infektion kann zur Entwicklung einer Leberzirrhose und eines Leberzellkarzinoms führen (1,2).

In diesem Projekt wurde untersucht, inwieweit genetische Polymorphismen (single nuclear polymorphisms, SNPs) im Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion stehen bzw. den Ausgang der antiviralen Therapie bestimmen. Erkenntnisse zu den Auswirkungen von genetischen Wirtsfaktoren bei Schlüsselproteinen der HCV-Infektion sollten zur Diagnose, Prognose und individuellen Therapie beitragen.

Neben den Co-Rezeptoren CD81 und SR-B1 wird dem LDL (low density lipoprotein)-Rezeptor (LDLR) eine essentielle Rolle beim Viruseintritt in die Zelle zugeschrieben. Da LDLR verschiedene regulative und immunmodulatorische Eigenschaften aufweist, stellt LDLR ein Schlüsselprotein der HCV-Infektion dar.

Aufgrund des Zusammenspiels verschiedener toll-like Rezeptoren (TLR) mit der HCV-Erkrankung und ihrer essentiellen Funktion in der angeborenen Immunantwort stellen TLR eine wichtige Komponente antiviraler Wirtsfaktoren dar.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Charakterisierung von genetischen Alterationen in immunregulatorischen Genen für Verlauf, Schweregrad und Therapieansprechen bei Hepatitis C Virus (HCV) Infektion (insbesondere Immunregulator TLR-7, CTLA4 sowie HCV Co-Rezeptor LDLR).

2. Voraussetzungen

Grundlage der Untersuchungen waren aus Blutproben isolierte genomische DNAs gut charakterisierter Patientenkollektive mit HCV Infektion, die vor allem Rahmen von klinischen Studien generiert wurden. In Kooperation mit weiteren Partnern im Kompetenznetz, insbesondere mit Kiel, Essen, Homburg, Aachen, Frankfurt/Main, Erlangen, Bonn, München (siehe Punkt 5 Zusammenarbeit) konnte eine „genetisches Netzwerk“ aufgebaut werden, dass essentiell für vorliegenden Arbeiten war und ist.

Alle im Rahmen der klinischen Studien erhobenen relevanten klinischen Daten wurden in einem umfangreichen Datenbanksystem erfasst. An einer Erweiterung beider Kollektive wird auch über dieses Projekt hinaus wird stetig gearbeitet.

An der Charité in Berlin wurde eine DNA-Bank mit Proben von 5800 Patienten mit Lebererkrankungen aufgebaut, davon 1580 Proben von Patienten mit HCV-Infektion. Die hierzu notwendige Genehmigung der Ethikkommission sowie die Einwilligung der Patienten liegen vor. Zusätzlich stehen Proben von ca. 3000 Patienten mit anderen Lebererkrankungen als Vergleichsgruppe zur Verfügung. Zudem wurden DNA-Banken verschiedener Kollektive von Kontrollpersonen aufgebaut. Die DNA-Bank umfasst ca. 1000 Proben gesunder Probanden verschiedener Ethnizität.

An diesem Kollektiv von Patienten soll zunächst die Bedeutung bereits bekannter Genpolymorphismen auf Entstehung, Ausprägung und Fortschreiten der Erkrankung mit der leistungsfähigen LightCycler-Technologie untersucht werden. Es soll geprüft werden, ob sich aus diesen Erkenntnissen Schlussfolgerungen für Diagnose, Prognose und Behandlungsstrategie ableiten lassen. Nachfolgend soll bei ausgewählten Patienten mittels SSCP-Analyse und direkter DNA-Sequenzierung untersucht werden, ob in weiteren aussichtsreichen Kandidatengenen neue krankheitsrelevante Mutationen nachzuweisen sind.

In ersten Analysen konnten wir bereits zeigen, dass Träger des Apolipoprotein E4 Allels auf eine antivirale Kombinationstherapie schlechter ansprechen als HCV-Patienten, die dieses Allel nicht tragen (3). Träger eines Polymorphismus in der 3'untranslatierten Region des Interleukin 12-Gens (1188C-Allel) erleiden dahingegen seltener einen Rückfall nach antiviraler Therapie und haben somit eine höhere Wahrscheinlichkeit eines dauerhaften virologischen Ansprechens bei Hepatitis C Infektion (4).

3. Planung und Ablauf

Untersuchungen zu genetischen Wirtsfaktoren wurde auf verschiedenen Ebenen durchgeführt. Zunächst wurden PCR-Systeme etabliert, um in den entsprechenden Patientenkollektiven das Auftreten der Polymorphismen in den zu untersuchenden Genregionen (unter anderen LDLR, TLR, CTLA4) darzustellen. Neben der Analyse bekannter Polymorphismen wurde durch Sequenzierung ebenso nach neuen Polymorphismen gesucht. Zur Identifizierung relevanter Polymorphismen wurden Datenbanken mit klinischen und genetischen Daten erstellt. Anhand statistischer Analysen wurden Polymorphismen im LDLR und TLR-7 gefunden, die im Zusammenhang mit Infektion und Therapie stehen. Somit wurde der Fokus weiterer Untersuchungen insbesondere auf diese Gene gelegt. LDLR wurde bezüglich Exon-8 (1171-G/A), Exon-10 (1506-G/A, rs5930) und 3'UTR (2728-G/A, rs14158) genotypisiert. Für TLR-7 wurden insgesamt 5 verschiedene SNPs identifiziert. Eine Variante (c.1-120T>G) wurde gehäuft bei männlichen Patienten mit wenig bis keiner Fibrose oder Entzündungserscheinungen gefunden. Weiterer Fokus wurde auf die funktionale Charakterisierung dieses Polymorphismus' gelegt.

Es wurden Reportersysteme etabliert, um den Einfluss von Polymorphismen auf die Zytokinantwort zu charakterisieren. Dazu wurden PBMCs von gesunden Probanden mit isogenischem TLR-7 bzw. TLR-8 isoliert und mit entsprechenden Agonisten stimuliert. Für TLR-7 kamen die Nukleosidanaloga Imiquimod und Isatoribin zum Einsatz, für TLR-8 wurde vorwiegend Resiquimod verwendet. Als read-out Systeme kamen vorwiegend TNF-alpha, IL-6 und IL-10 zum Einsatz.

4. Wissenschaftlicher Hintergrund

In den letzten Jahren wurde zunehmend der Einfluss von Veränderungen im menschlichen Erbgut auf Entstehung und Ausprägung von Erkrankungen erkannt. So gelang es, Gene und Mutationen zu identifizieren, die zur Entstehung bestimmter familiärer Lebererkrankungen führen. Es finden sich zunehmend Hinweise, dass auch bei primär nicht genetisch bedingten Lebererkrankungen (viral, autoimmun, metabolisch, toxisch, maligne) die genetische Disposition eines Individuums eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung, Ausprägung und Therapieansprechen hat.

Der klinische Verlauf einer Hepatitis C-Infektion wird maßgeblich durch die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts bestimmt. Genetische Faktoren, die die Immunantwort bei HCV beeinflussen, wurden für IL-10, IL-12B, RANTES, MxA und CTLA4 beschrieben (5-13).

Das TLR-System ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität. Werden dem TLR-System bestimmte konservierte Erregermuster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan (PG) oder Nukleinsäure (dsRNA, ssRNA, nicht-methylierte CpG DNA) präsentiert, kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Signal-Transduktions-Kaskaden. Hierdurch werden Mediatoren des angeborenen Immunsystems induziert, vornehmlich inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interferon, TNF-alpha und Interleukin. TLRs sind vorwiegend extrazelluläre Membranproteine, nur die erst kürzlich entdeckten und eng verwandten TLR-7 und TLR-8 sind ausschließlich intrazellulär im Endosom lokalisiert (14-16). Insbesondere TLR-7 und TLR-8 liegen hintereinander auf dem X-Chromosom und erkennen beide einzelsträngige Nukleinsäuren. Allen TLRs gemein ist die Signalling-vermittelnde Toll-IL-1-Rezeptor Domäne (TIR) und eine Leuzin-reiche Wiederholungs- Domäne (leucine-rich repeat - LRR). Werden dem TLR-System bestimmte PAMPs präsentiert, kommt es zur Signaltransduktion.

Die Analyse von TLR Nukleotidpolymorphismen hat gezeigt, dass ihnen eine Schlüsselrolle im Verlauf von verschiedenen Infektions- und entzündlichen Erkrankungen zukommt (17-20).

Im Zusammenhang mit HCV wurden zunächst zwei Interaktionen mit dem TLR-System beschrieben (21-22). Duesberg und Kollegen haben synthetische Lipopeptide aus T-Zell-Epitopen des Capsid-Proteins (Core) zur Stimulation von TLR-2 und -4 eingesetzt und konnten zeigen, dass die synthetischen Core-Epitope (lipified, not free-peptide) TLR-2 in 293 und TLR-4 in Ba/F3 Zellen den NFkappaB-Luc Reporter induzieren. Breiman und Kollegen konnten zeigen, dass die NS3/4A vermittelte Inhibition der IRF-3 Phosphorylierung und die damit verbundene Inhibition der Typ-I IFN-Induktion oberhalb der IKK α und TBK-1 liegt. NS3/4A inhibiert Typ-I IFN-Induktion sowohl über die TLR-3, -4, -7/8 und -9, als auch TLR unabhängig über RIG-1. RIG-1 ist eine Helicase mit so genannten Caspase Recruitment Domänen (CARDs). RIG interagiert mit Virus und legt die „versteckten“ CARDs frei und induziert damit Typ-I Interferon. Überexpression von IKK α konnte Typ-I IFN widerherstellen, überexpression von RIG-1 nicht.

Ein direkter therapeutischer Nutzen für die HCV-Therapie konnte kürzlich für den TLR-7 Agonisten Isatoribin gezeigt werden (23). Des Weiteren zeigen verschiedene aktuelle Untersuchungen, dass TLR bei chronischen Hepatitis Patienten differentiell exprimiert werden (24-25) [8, 12]. Taylor und Kollegen haben gezeigt, dass TLR-7 bei therapieresistenten Patienten (non-responder, NR) herunterreguliert ist (26).

Immer mehr Daten zur Virus-Wirts Interaktion, insbesondere der Rezeptorbindung, ermöglichen eine gezielte Suche nach Polymorphismen, die signifikant auf Infektion bzw. Therapie wirken. Der Eintritt von HCV in die Wirtszelle benötigt verschiedene Co-Rezeptoren, insbesondere CD81 und SR-B1 (27-31) [1, 4, 18, 19, 24]. Da HCV-RNA Level mit LDLR-Expression korrelieren (32, 33) [3, 15], das virale Hüllprotein E2 direkt mit LDLR und HCV-Partikel mit Lipoproteinen interagieren (34) [23], stellt LDLR einen wichtigen Wirtsfaktor und damit ein putatives Ziel von Therapeutischen Ansätzen dar.

Genetische Faktoren, die die Suszeptibilität gegenüber der antiviralen Therapie beeinflussen würden nicht nur helfen die individuelle Prognose des Patienten besser vorher zu sagen, sondern könnten auch dazu beitragen anhand des genetischen Risikoprofils individuelle Therapie-Regime einzusetzen.

Zu den genetische Varianten die in mindestens zwei unabhängigen Studien bestätigt, mit der Therapie Response, assoziiert sind, gehören Polymorphismen des Interleukin 10 Gens, Myxovirus Resistance-1 Gen (MxA) und das CC chemokine receptor 5 Gene (CCR5) (5-13).

5. Genetische Variationen und Fibroseprogression

Die Fibroseprogressionsrate ist hoch variabel bei Patienten mit chronischer Hepatitisvirus-Infektion. Es wird geschätzt dass nur zirka 20 bis 30% aller infizierten Patienten im Verlauf von 20 Jahren eine Cirrhose entwickeln. Zu den bisher bekannten Risikofaktoren für die Fibroseprogression gehören männliches Geschlecht, Alkoholabusus, höheres Alter zum Zeitpunkt der Infektion sowie das Vorhandensein einer Steatose (35-37). Es gibt zunehmend Hinweise dass genetische Faktoren einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung und Progression der Fibrose darstellen können. Die Aufklärung dieser Faktoren wird einen bedeutenden Schritt zur Verbesserung des Managements von Patienten mit chronischer Hepatitis C darstellen (37-40).

6. Zusammenarbeit

Prof. Dr. Eckart Schreier
Robert Koch Institut
Molekulare Epidemiologie viraler Erreger
NRZ und RRL (WHO-EURO) für Poliomyelitis und Enteroviren
Konsiliarlabor für Norovirus
Konsiliarlabor für Rotavirus
Nordufer 20
13353 Berlin
Tel: 03018754-2379
Fax:03018754-2617
E-Mail: schreiere@rki.de

PD Dr. med. Holger Hinrichsen
Department of Medicine I
(Director: Prof. Dr. U.R. Fölsch)
University Hospital Schleswig-Holstein
Schittenhelmstraße 12
24105 Kiel
Email: hhinrichsen@1med.uni-kiel.de

PD Dr. med. Christoph Sarrazin
Department of Medicine II
(Director: Prof. Dr. S. Zeuzem)
University Hospital Homburg
Kirrberger Straße
66421 Homburg
Email: christoph.sarrazin@uniklinikum-saarland.de

Prof. Dr. med. Frank Lammert and Prof. Dr. med. Ulrich Spengler
Department of Medicine I
(Director: Prof. Dr. T. Sauerbruch)
University Hospital Bonn
Sigmund-Freud-Straße 25
53105 Bonn
Email: frank.lammert@ukb.uni-bonn.de, ulrich.spengler@ukb.uni-bonn.de

PD Dr. med. Hermann Wasmuth
Department of Medicine III
(Director: Prof. Dr. C. Trautwein)
University Hospital Aachen
Pauwelsstraße 30
52057 Aachen
Email: hwasmuth@ukaachen.de

Prof. Dr. W. Siffert
Institut für Pharmakogenetik
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55
45122 Essen
email: winfried.siffert@uk-essen.de

Dr. Djin-Ye Oh, Prof. Dr. Ralf Schumann
Universitätsmedizin Berlin,
Institut für Mikrobiologie und Hygiene Campus Charité Mitte
Campus Charité Mitte

II Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Zahlreiche unterschiedliche genetische Varianten, die potentiell den Verlauf und die therapeutischen Suszeptibilität der HCV-Infektion beeinflussen können wurden untersucht. Die Mehrzahl der Untersuchungen sind bereits in „peer review“ Zeitschriften veröffentlicht und werden daher hier nur in kurzer Form zusammengefasst:

2. TLR7 Polymorphismen und HCV Infektion

Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halangk J, Weich V, Wiedenmann B, **Berg T**. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol*. 2007 Aug;47(2):203-11.

Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B, **Berg T**. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. *J Viral Hepat*. 2008 Jan;15(1):71-8.

Für die Untersuchungen zum TLR7-Polymorphismus wurde der Leserahmen und die Promotorregion bei 104 Individuen sequenziert. Hierbei wurden 5 Polymorphismen gefunden, 3 bekannte c.32A>T (rs 179008) 32%, c.1035G>A (rs 5743780) 2% und c.2403G>A (rs 864058) 8%, sowie zwei neue Polymorphismen c.1-346T>A, <1% und c.1-120T>G, 6%. Von den identifizierten Polymorphismen war einer nicht synonym und drei hatten eine Frequenz über 5%. Mittels Schmelzkurven Analysen wurden insgesamt 807 HCV Patienten auf die Polymorphismen c.1-120T>G, c.32A>T und c.2403G>A untersucht, diese Daten wurden an der Charité in der Gruppe von Prof. Dr. Berg durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere der neu entdeckte Polymorphismus c.1-120T>G im TLR7-Promotorbereich bei Männer vor Fibrose und Entzündung schützt.

Um weiteren Aufschluss über die Relevanz des Austausches c.1-120T>G auf TLR7 zu erhalten wurden funktionale Assays etabliert, um den Einfluss des nicht-codierenden SNPs auf die antivirale Zytokinantwort zu zeigen. Hierzu wurde zunächst in einem Kollektiv von 98 gesunden Probanden das Auftreten von c.1-120T>G bestimmt, dabei wurden 2 hemizygoten Männer und 9 heterozygoten Frauen identifiziert. Beide hemizygoten Männer waren Wildtyp für die anderen TLR-7 und TLR-8 Polymorphismen. Zur Untersuchung der funktionalen Relevanz des c.1-120T>G SNPs, wurden PBMCs von beiden gesunden männlichen Probanden isoliert und mit den TLR-7 spezifischen Liganden Imiquimod und Isatoribin, sowie einem TLR-4 spezifischen Liganden (LPS) stimuliert. Nach Stimulation von TLR-7 mit Imiquimod und Isatoribin wurde eine erhöhte IL-6 Ausschüttung bei den hemizygoten G-Allelträgern beobachtet, wobei nach LPS-Stimulation keine Unterschiede beobachtet wurden. Daher wird angenommen, dass der Effekt des TLR-7 SNP c.1-120T>G in Verbindung mit höherer IL-6 Ausschüttung bei hemizygoten Männern mit einem Schutz vor Fibrose und Entzündung assoziiert ist.

3. CTLA4-Polymorphismen und HCV-Infektion

Schott E, Witt H, Hinrichsen H, Neumann K, Weich V, Bergk A, Halangk J, Müller T, Tinjala S, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Berg T. Gender-dependent association of CTLA4 polymorphisms with resolution of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):372-80.

Schott E, Witt H, Pascu M, van Boemmel F, Weich V, Bergk A, Halangk J, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B, Berg T Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;19(11):947-51.

Eine effektive T-Zell-Response ist essenziell für die Ausheilung der Hepatitis C. Virusinfektion. CTLA4 ist ein inhibitorischer T-Zell Rezeptor, der auf aktivierten und regulatorischen T-Lymphozyten exprimiert wird. Verschiedene SNPs von CTLA4 sind bekannt (-318C>T in der Promotorregion und +49A>G im ersten Exon). Lymphozyten von Individuen mit diesem genetischen Varianten zeigen eine Störung der inhibitorischen Funktionen in vitro. Polymorphismen sind mit Autoimmunerkrankungen assoziiert worden. Wir haben 127 Individuen mit selbst limitierter und 947 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion sowie 200 gesunde Kontrollen untersucht. 560 der 947 Patienten mit chronischer Hepatitis C. haben eine Interferon-basierte Therapie erhalten. Die

Polymorphismen -318C>T in der Promotorregion und +49A>G im ersten Exon wurden mittels Schmelzkurvenanalyse untersucht; Haplotypen wurden rekonstruiert.

Die CTLA4-Haplotypen waren unterschiedlich verteilt bei Männern mit selbst limitierter und chronischer Hepatitis C. Virusinfektion, nicht jedoch bei Frauen. Die Haplotypen waren nicht mit dem Stadium der Fibrose assoziiert. Eine signifikante Korrelation zeigte sich auch für das virologische Therapie ansprechen. Dieser Effekt war jedoch erneut nur bei Männern zu beobachten. Auch mittels logistischer Regressions-Analyse bestätigte sich ein geschlechtsspezifischer Effekt der CTLA4 Haplotypen hinsichtlich der Therapieresponse. Die Studie unterstreicht die Bedeutung einer effizienten T-Zell-Response für die Elimination der HCV Infektion und gibt Hinweise für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunregulation.

Die zweite Studie umfasst 2366 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, davon 323 Patienten mit chronischer Hepatitis B., 1181 Patienten mit chronischer Hepatitis C. 180 Patienten mit PBC ohne 127 Patienten mit autoimmuner Hepatitis sowie 202 gesunde Kontrollen.

Die -318C>T Variationen war unterrepräsentiert bei Patienten mit chronischer Hepatitis b Infektion im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und übrigen Patienten mit chronischen Lebererkrankungen (14.6% vs.25.7%; $p=0.002$). Auch Patienten mit kryptogener Cirrhose hatten eine niedrigere Frequenz der -318C>T Variante im Vergleich zu dem gesunden Kontrollen (12% versus 25,7%, $P=0.014$). Der +49G>A Genotyp waren nicht signifikant unterschiedlich verteilt bei Patienten mit verschiedenen chronischen Lebererkrankungen oder gesunden Kontrollen.

4. TLR4/CD14-Polymorphismen und HCV-Infektion

Von Hahn T, Halangk J, Witt H, Neumann K, Müller T, Puhl G, Neuhaus P, Nickel R, Beuers U, Wiedenmann B, Berg T. Relevance of endotoxin receptor *CD14* and *TLR4* gene variants in chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42. Epub ahead of print]

Die Lipopolysaccharide (LPS)-getriggerte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen von Kupffer Zellen, wird über den CD14/TLR4 Rezeptorkomplex vermittelt. Die -260 C>T Transition im CD14 Promotor ist mit einer gesteigerten CD14 Expression assoziiert und damit mit einer erhöhten LPS Responsiveness. Im Gegensatz dazu führt der Austausch an Position D299G im TLR4 Gen zu einer verminderten LPS Antwort. Die Studie hatte zum Ziel die beschriebenen Varianten hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Verlauf chronischer Lebererkrankungen, insbesondere der chronischen Hepatitis C, zu untersuchen.

1712 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sowie 385 gesunde Kontrollen wurden in die Studie eingeschlossen. Die Genotypisierung wurde mittels Schmelzkurvenanalyse mit „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) Proben im light cyclus durchgeführt.

Die Häufigkeit der Genotypen CD14 -260 C>T und TLR4 D299G unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Patienten und Kontrollen. Es zeigte sich ebenso keine signifikante Korrelation mit dem Verlauf der Erkrankung sowohl bei den Patienten mit alkoholischen Lebererkrankungen als auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. im Vergleich zu den gesunden Kontrollen fanden wir bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit einer milden ätiologisch unklaren chronischen Lebererkrankungen eine signifikante Häufung des CD14 -260 TT Genotyps (36.6% versus 21,8%, $p=0.036$).

5. LDL-Rezeptor Polymorphismen und HCV Infektion

Mueller T, Mas Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Wasmuth H, Ahlenstiel G, Spengler U, Lammert F, Schott E, Weich V, Schreier E, Wiedenmann B, Berg T: Low-density lipoprotein receptor (LDLR) Polymorphisms are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from Hepatitis C-virus (HCV) infection. *Hepatology* 2007; 46 S1: 629A.

Im Rahmen von therapeutischen Studien wurde DNA von HCV-Patienten asserviert und klinische Daten in einer Datenbank zusammengefasst. Mittels Real-Time PCR wurden Polymorphismen im LDLR im Exon 8, Exon 10 und in der 3'UTR bei 1350 Individuen in Kooperation mit Prof. Schreier, RKI, untersucht. Dies beinhaltete 174 Individuen mit spontaner Ausheilung, 660 chronische Patienten und 516 gesunde Kontrollen, die Charakterisierung dieser Polymorphismen wurden am RKI durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu chronischen HCV1 Patienten und gesunden Kontrollen, eine selbst-limitierende HCV Genotyp-1 (HCV1) Infektion assoziiert ist mit einem Austausch G>A im Exon 8 und Heterozygotie von 1506-G im Exon 10. Interessanterweise hatten, in Bezug auf chronische HCV1 Infektion, homozygote Träger 2728-G Allels in der 3'-UTR ein hoch signifikantes Risiko nicht auf Therapie anzusprechen (NR). Das galt insbesondere, wenn noch keine schwere Leberschädigung vorlag. Daher könnte das 3'-UTR Allel einen wichtigen therapeutischer Marker für virale NR darstellen.

6. Genetische Variationen und Fibroseprogression bei der HCV Infektion

Mutationen im HFE Gen sind eine wichtige Ursache für eine Eisenüberladung beim Menschen. Es wird vermutet, dass eine Eisenüberladung einen zusätzlichen Risikofaktor für die Krankheitsprogression bei Patienten mit chronischer Hepatitis C darstellt (38, 39). Wir untersuchten die Relevanz von drei HFE Variationen (H63D, S65C, C282Y) hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Fibrose-Progression bei 651 Patienten mit chronischer Hepatitis C. Unsere Studie ergab keinen Hinweis dafür, dass das Vorliegen der HFE Variationen mit einem erhöhten Risiko für die Krankheitsprogression oder Karzinom-Entwicklung einhergeht. Auch war das Therapieansprechen nicht durch die genetischen Varianten beeinflusst
Gabelein G, Halangk J, Witt H, Puhl G, Müller T, Landt O, Tullius S, Neuhaus P, Wiedenmann B, Luck W, Berg T. Evaluation of HFE mutations as inherited risk factors for the development of chronic liver disease of different etiologies. *Hepatology* 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 578A.

Halangk J, Witt H, Puhl G, Gäbelein G, Müller T, Landt O, Neuhaus P, Wiedenmann B, Luck W, Berg T. Evaluation of HFE mutations in patients with chronic hepatitis C Virus (HCV) infection. *Hepatology* 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 683A.

Kürzlich wurde eine Assoziation von genetischen Varianten im Komplementfaktor 5 (C5) Gen mit einer gesteigerten Fibroseprogression bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beschrieben (40). Die Risikovarianten (rs17611 und rs2300929) wurden in einer Gruppe von 1196 chronisch HCV-infizierter Patienten untersucht. Wir konnten keine Unterschiede in den Genotyp und parallele Häufigkeiten zwischen Patienten mit milder (Stadium 0-1) und solchen mit fortgeschrittener Fibrose (Stadium 2-4) nachweisen.

(Halangk J, Sarrazin C, Neumann K, Puhl G, Teuber G, Klinker H, Hinrichsen H, Buggisch P, Weich V, Bergk A, Wiedenmann B, Neuhaus P, Berg T and Witt H. Evaluation of complement factor 5 variants as genetic risk factors for the development of advanced fibrosis in chronic hepatitis C infection., eingereicht.

Halangk J, Sarrazin C, Puhl G, Teuber G, Klinker H, Buggisch P, Hinrichsen H, Weich V, Bergk A, Wiedenmann B, Neuhaus P, Witt H, Berg T. Complement factor 5 is no genetic risk factor for the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C-infection. *J Hepatol* 2006; 44:Suppl. 2; S199

7. Verwertbarkeit

Die Aufklärung genetischer Mechanismen für den Verlauf und die Therapie der HCV Infektion stellen einen bedeutenden Schritt zur Verbesserung des Managements von Patienten mit chronischer Hepatitis C dar:

1. über ein besseres Verständnis der pathogenetischen Mechanismen der Erkrankung könnten neue therapeutische Targets identifiziert werden
2. Patienten mit augenscheinlich gleichen Krankheitsphänotyp könnten spezifischeren Therapieformen zugeführt werden und

3. die Identifizierung von genetischen Faktoren die das Risiko der Krankheitsprogression erhöhen könnte dazu beitragen durch eine bessere Prognosedetermination das individuelle Management der Patienten zu verbessern.

Aufgrund der Relevanz der LDLR Polymorphismen, insbesondere der 3'-UTR, auf das Therapieansprechen bei HCV1-Infektion eignen sich diese Polymorphismen als genetische Marker für Therapieansprechen. Da gezeigt wurde, dass intrazelluläre HCV-RNA Titer mit dem Expressionlevel des LDLR assoziiert sind, birgt die Regulation von LDLR die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

Diese Untersuchungen unterstreichen den Einfluss von genetischen Wirtsfaktoren auf das angeborene Immunsystem. Verschiedene Daten zeigen einen Einfluss von TLR-7 auf die HCV-Erkrankung und Therapie. Die Stimulation von TLR-7 führte zu einer direkten Reduktion von HCV-RNA im Serum, was in direktem Zusammenhang mit einer IFN-alpha Response gezeigt wurde.. Dennoch wurde kürzlich ein IFN-alpha unabhängiger Weg der antiviralen Immunantwort gegen HCV gezeigt. Diese Daten unterstützen, dass es neben der IFN-Antwort andere relevante Strategien zur Bekämpfung von HCV gibt und die Ausschüttung von IL-6 nach TLR-7 Stimulation einen signifikanten Einfluss auf Fibrose und Entzündung der Leber hat.

8. Eigene Veröffentlichungen

Ahlenstiel G, **Berg T**, Woitas R, Grünhage F, Iwan A, Heß L, Brackmann HH, Kupfer B, Schernick A, Sauerbruch T, Spengler U. Effects of the CCR5-Δ32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 39: 245-252.

Müller T, Geßner R, Sarrazin C, Graf C, Halangk J, Witt H, Köttgen E, Wiedenmann B, **Berg T**. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 2003, Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 2003; 38: 1592.

Halangk, J, **Berg T**, Puhl G, Müller T, Nickel R, Kage A, Landt O, Luck W, Wiedenmann B, Neuhaus P, Witt H. Keratin 8 Y54H and G62C mutations are not associated with liver disease. *J Med Gen* 2004; 41: E92.

Hesse M, Woitas RP, **Berg T**, Wiedenmann B, Spengler U, Magin TM. A frequent keratin 8 p.L227L polymorphism but no point mutations in keratin 8 and 18 genes in patients with various liver disorders. *J Med Genet.* 2004; 41: E42.

Mueller T, Andreas Mas-Marques, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, Spengler U, Goebel U, Wiedenmann B, Schreier E, **Berg T**. Influence of Interleukin 12B (IL12B) Polymorphisms on Spontaneous and Treatment-induced Recovery from Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *J Hepatol* 2004, 41: 652-658

Wasmuth HE, Werth A, Müller T, **Berg T**, Dietrich CG, Geier A, Schirin-Sokhan R, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, Lammert F. CC Chemokine Receptor 5 Δ32 polymorphism in two independent cohorts of HCV infected Caucasian patients without hemophilia. *J Mol Med.* 2004; 82:64-69.

Wasmuth HE, Werth A, Mueller T, **Berg T**, Dietrich CG, Geier A, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, Lammert F. Haplotype-tagging *RANTES* gene variants influence response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2004; 40: 327-334.

Nattermann J, Ahlenstiel G, **Berg T**, Muller T, Feldmann G, Nischalke H-D, Rockstroh J, Woitas R, Sauerbruch T, Spengler U. The tandem repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene in HCV infection. *J Viral Hepat* 2006; 13: 42-46 (IF: 2.841).

Feldmann G, Nischalke HD, Nattermann J, Banas B, **Berg T**, Teschendorf C, Schmiegel W, Duhrsen U, Halangk J, Iwan A, Sauerbruch T, Caselmann WH, Spengler U. Induction of interleukin-6 by hepatitis C virus core protein in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia and B-cell non Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4491-4498. (IF: 5.715).

Sarrazin C, **Berg T** (contributed equally), Weich V, Mueller T, Frey UH, Zeuzem S, Gerken G, Roggendorf M, Siffert W. GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa/ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection. *J Hepatol* 2005; 43: 388-393 (IF: 4.816). (SCI=0).

Nattermann J, Vogel M, **Berg T**, Danta M, Axel B, Mayr C, Bruno R, Tural C, Klausen G, Clotet B, Lutz T, Grünhage F, Rausch M, Nischalke HD, Schewe K, Bienek B, Haerter G, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U; Kompetenznetz HIV/AIDS. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. *Hepatology*. 2007; 46: 1016-1025.

Ahlenstiel G, Nischalke HD, Bueren K, **Berg T**, Vogel M, Biermer M, Grünhage F, Sauerbruch T, Rockstroh J, Spengler U, Nattermann J. The GNB3 C825T polymorphism affects response to HCV therapy with pegylated interferon in HCV/HIV co-infected but not in HCV mono-infected patients. *J Hepatol*. 2007; 47: 348-55.

Schott E, Witt H, Hinrichsen H, Neumann K, Weich V, Bergk A, Halangk J, Muller T, Tinjala S, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, **Berg T** Gender-dependent association of CTLA4 polymorphisms with resolution of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):372-80.

Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halangk J, Weich V, Wiedenmann B, **Berg T**. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol*. 2007 Aug;47(2):203-11.

Nattermann J, Vogel M, **Berg T**, Danta M, Axel B, Mayr C, Bruno R, Tural C, Klausen G, Clotet B, Lutz T, Grünhage F, Rausch M, Nischalke HD, Schewe K, Bienek B, Haerter G, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. *Hepatology*. 2007 Aug 1;46(4):1016-1025

Schott E, Witt H, Pascu M, van Boemmel F, Weich V, Bergk A, Halangk J, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B, **Berg T** Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;19(11):947-51.

Wasmuth HE, Zaldivar MM, Berres ML, Werth A, Scholten D, Hillebrandt S, Tacke F, Schmitz P, Dahl E, Wiederholt T, Hellerbrand C, **Berg T**, Weiskirchen R, Trautwein C, Lammert F. The fractalkine receptor CX3CR1 is involved in liver fibrosis due to chronic hepatitis C infection. *J Hepatol*. 2007 Nov 20; [Epub ahead of print]

von Hahn T, Halangk J, Witt H, Neumann K, Müller T, Puhl G, Neuhaus P, Nickel R, Beuers U, Wiedenmann B, **Berg T**. Relevance of endotoxin receptor *CD14* and *TLR4* gene variants in chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42. Epub ahead of print]

Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B, **Berg T**. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. J Viral Hepat. 2008 Jan;15(1):71-8.

Publikationen als Abstracts:

Gabelein G, Halangk J, Witt H, Puhl G, Müller T, Landt O, Tullius S, Neuhaus P, Wiedenmann B, Luck W, Berg T. Evaluation of HFE mutations as inherited risk factors for the development of chronic liver disease of different etiologies. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 578A.

Halangk J, Witt H, Puhl G, Gäbelein G, Müller T, Landt O, Neuhaus P, Wiedenmann B, Luck W, Berg T. Evaluation of HFE mutations in patients with chronic hepatitis C Virus (HCV) infection. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 683A.

Halangk J, Sarrazin C, Puhl G, Teuber G, Klinker H, Buggisch P, Hinrichsen H, Weich V, Bergk A, Wiedenmann B, Neuhaus P, Witt H, **Berg T**. Complement factor 5 is no genetic risk factor for the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C-infection. J Hepatol 2006; 44:Suppl. 2; S199

Mueller T, Mas Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Wasmuth H, Ahlenstiel G, Spengler U, Lammert F, Schott E, Weich V, Schreier E, Wiedenmann B, **Berg T**: Low-density lipoprotein receptor (LDLR) Polymorphisms are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from Hepatitis C-virus (HCV) infection. Hepatology 2007; 46 S1: 629A.

Mueller T, Gessner R, Sarrazin C, Koettgen E, Halangk J, Schott E, Bergk A, Weich V, Schlosser B, Wiedenmann B, **Berg T**: Apolipoprotein E4 (APOE4) allele protects from chronic Hepatitis C virus (HCV) infection. Hepatology 2007; 46 S1: 635A.

9. Folgende Manuskripte wurden zu Publikation eingereicht:

Halangk J, Sarrazin C, Neumann K, Puhl G, Teuber G, Klinker H, Hinrichsen H, Buggisch P, Weich V, Bergk A, Wiedenmann B, Neuhaus P, **Berg T** and Witt H. Evaluation of complement factor 5 variants as genetic risk factors for the development of advanced fibrosis in chronic hepatitis C infection., eingereicht

Scholten D, Trautwein C, Weiskirchen R, Zaldivar MM, Hellerbrand C, Hillebrandt S, Wiederholt T, Schmitz P, Goos C, Keppeler H, **Berg T**, Friedman SL, Dahl E, Donner A, Lorenzen J, Lammert F, Wasmuth HE. CXCL9 and its receptor CXCR3 are a chemokine-based antifibrotic pathway in the liver

Andreas Mas Marques, Tobias Mueller, Justus Welke, Stefan Taube, Christoph Sarrazin, Manfred Wiese, Juliane Halangk, Heiko Witt, Golo Ahlenstiel, Ulrich Spengler, Uwe Goebel, Eckart Schott, Viola Weich, Hermann E. Wasmuth, Frank Lammert, **Thomas Berg**, Eckart Schreier. Low density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection, J. of Hepatology, submitted

Taube S., Mas Marques A., **Berg T.**, Schreier E. The Hepatitis C Virus NS5A Protein Inhibits Interferon Induced Signalling Independent of the ISDR, in preparation

Insgesamt konnten die Untersuchungen zu genetischen Wirtsfaktoren bei viraler Hepatitis erfolgreich abgeschlossen werden. Die genetischen Datenbanken stehen für andere Fragestellungen zur Verfügung und werden weiter betreut.

III Literatur

1. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999;285:26-30.
2. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
3. Müller T, Gessner R, Sarrazin C, Graf C, Halangk J, Witt H, Kottgen E, Wiedenmann B, Berg T. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 2003;38:1592
4. Müller T, Mas-Marques A, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiehl G, Goebel U, Wiedenmann B, Schreier E, Berg T. Influence of Interleukin 12B (IL12B) Polymorphism in Spontaneous and Treatment-induced Recovery from Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *J Hepatol* 2004;41:652-658
5. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-30.
6. Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 2003;55:362-9.
7. Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124-7.
8. Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, et al. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 2001;44:379-82.
9. Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, et al. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352-60.
10. Konishi I, Horiike N, Hiasa Y, et al. CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan. *Intervirology* 2004;47:114-20.
11. Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, et al. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-320.
12. Lazaridis KN, Juran BD. American Gastroenterological Association future trends committee report: the application of genomic and proteomic technologies to digestive disease diagnosis and treatment and their likely impact on gastroenterology clinical practice. *Gastroenterology* 2005;129:1720-52.
13. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468-76.
14. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-31

15. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-9
16. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5598-603
17. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR (2006) Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 364: 303-7
18. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ, Tulassay T, Reusz GS (2007) Heat shock protein 72 (HSPA1B) Gene Polymorphism and toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res* 61: 371-4
19. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schroder NW, Bienzle U, Schumann RR (2006) Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 177-82
20. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, Maggi FM, Catapano AL (2005) Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med* 258: 21-7
21. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF (2005) Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 79: 3969-78
22. Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U (2002) Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett* 84: 89-95
23. Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR (2005) Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 42: 724-31
24. He Q, Graham CS, Mangoni ED, Koziel MJ (2006) Differential expression of toll-like receptor mRNA in treatment non-responders and sustained virologic responders at baseline in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 26: 1100-10
25. Lee J, Wu CC, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, Liu YT, Chan M, Tawatao R, Chung M, Shen C, Cottam HB, Lai MM, Raz E, Carson DA (2006) Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1828-33
26. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L, Schaley J, Sanda C, Stephens MJ, McClintick JN, Edenberg HJ, Li L, Tavis JE, Howell C, Belle SH (2007) Changes in gene expression during peginterferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C distinguish responders from non responders to antiviral therapy. *J Virol*
27. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278: 41624-30

28. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7270-4
29. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-41
30. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21: 5017-25
31. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78: 1448-55
32. Carriere M, Rosenberg AR, Conti F, Chouzenoux S, Terris B, Sogni P, Soubrane O, Calmus Y, Podevin P (2006) Low density lipoprotein receptor transcripts correlates with liver hepatitis C virus RNA in patients with alcohol consumption. *J Viral Hepat* 13: 633-42
33. Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P (2007) The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46: 411-9
34. Thomssen R, Bonk S, Thiele A (1993) Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182: 329-34
35. Feld JJ, Liang TJ. Hepatitis C - identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology* 2006;43:S194-206.
36. 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;349:825-32.
37. Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, et al. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet* 2005;42:e45.
38. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:335-42.
39. Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I, et al. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med* 2003;81:780-7.
40. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Schirin-Sokhan R, Wilkens G, Geier A, Lorenzen J, Köhl J, Gressner AM, Matern S, Lammert F. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nature Genet* 2005;37:835-843 [IF 24.7]