

## **Abschlussbericht Teilprojekt 11.2**

**Projekttitel:** Mechanismen der Fibroseprogression bei der chronischen Hepatitis C

**Projektleiter:** Prof. Dr. Dr. D. Schuppan  
Aktuelle Dienstadresse:  
Division of Gastroenterology and Hepatology,  
Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School,  
Dana 506  
330 Brookline Ave, Boston, MA 02215  
USA

**Telefon:** +1(0) 617-6672371, 617-6678377

**Fax:** +1(0) 617-6672767

**E-Mail:** dschuppa@bidmc.harvard.edu

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

### **Mitantragsteller:**

Dr. Anja Schulze-Krebs

Med. Klinik I, FAU Erlangen-Nürnberg

Labor Glückstr. 10

### **Aufgabenstellung**

Es sollen die bei der HSZ/MF-Aktivierung und Fibrose-Initiierung relevanten HCV-Proteine, welche für die Freisetzung der HCV-spezifischen fibrogenen Mediatoren verantwortlich sind in Hepatozyten identifiziert werden, auch im Zusammenspiel mit Makrophagen/Kupfferzellen. Nach Eingrenzung der freigesetzten profibrogenen Faktoren, die HSZ/MF zur Proliferation und exzessiven Matrixproduktion stimulieren, sollen die molekularen Mechanismen (Protein-Proteininteraktionen, Modulation der Signaltransduktion, Induktion von oxidativem Stress) in den HCV-replizierenden Hepatozyten charakterisiert werden. Die Charakterisierung der dazugehörigen Signaltransduktionswege bzw. molekularer Mechanismen mit Hilfe geeigneter Antikörper erfolgt bereits.

Hierfür wird einerseits das Repliconsystem mit dem vollständigen Leserahmen des HCV-Genotyp 1b (zur Verfügung gestellt von Dr. R. Bartenschlager) eingesetzt, andererseits werden die HCV-Gene Core, NS3, NS3/NS4A, NS4, NS5A einzeln in Huh-7-Zellen transfiziert. Darüberhinaus wird die Potenzierung der profibrogenen Geninduktion in Huh-7-Zellen durch Kokultur mit Hepatozyten, die das pro-oxidative Enzym Cytochrom P450 E2 (Cytochrom P450 E2 ist das primäre Alkohol metabolisierende Enzym; durch welches der oxidative Stress der Hepatozyten erhöht wird) überexprimieren und Inkubation mit Ethanol. Dies entspricht der klinisch beobachteten Potenzierung des Zirrhoserisikos bei bereits geringem Alkoholkonsum.

### **Eigene Vorarbeiten und Voraussetzungen**

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Pathobiochemie und Zellbiologie der extrazellulären Matrix (EZM). Der klinische Schwerpunkt liegt bei Organfibrosen,

insbesondere der Leberfibrose, dem Tumorwachstum und der Metastasierung. Ziel der Arbeiten ist, Therapieformen zu entwickeln, welche organ- und zellspezifisch angreifen. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine genaue Kenntnis der molekularen Prozesse, die z.B. bei einer Hepatitis C Infektion zur Leberfibrose führen, um frühzeitig und nichtinvasiv Prognose und Verlauf abschätzen zu können und effektive Therapien zu entwickeln.

Um die Frage zu klären, welche Mediatoren nach Hepatitis C Infektion für die fortschreitende Fibrosierung der Leber verantwortlich sind, steht uns durch eine Kooperation mit Dr. R. Bartenschlager (Heidelberg) ein replizierendes HCV-Zellkultursystem zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine Huh-7 Zelllinie, welche mit den nicht-strukturellen HCV-Genen NS3-NS5B stabil transfiziert ist (Huh-7 Klon 5-15). Als Negativkontrolle dient uns eine scheintransfizierte Huh-7 Zelllinie (Huh-7 Klon pcDNA3) (Science 285: 110-113, 1999). Zusätzlich verfügt die Arbeitsgruppe von Prof. Bartenschlager über Huh-7 Zelllinien, welche das gesamte HCV-Genom stabil exprimieren. Durch Quantifizierung der mRNA nach Inkubation geeigneter Zelllinien mit konditionierten Medien dieser unterschiedlichen Zelltypen im LightCycler konnten wir bereits zeigen, daß die Replicon-Zelllinie den zentralen profibrogenen Mediator TGF $\beta$ 1 im Gegensatz zur Negativkontrolle vermehrt synthetisiert und zwar sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene (Abb.1). Bei diesen Replicon-Zellen handelt es sich im Moment um das am besten akzeptierte experimentelle System, daß der *in vivo* Situation am nächsten kommt. Daten von Maus-Zelllinien, welche einzelne HCV-Gene exprimieren bzw. transgene Tiere mit chimären Maus-Human-Lebern, sind oft widersprüchlich z.B. in Hinblick auf eine Entwicklung eines HCC bzw. zeigen wenig profibrotische Aktivität. Zelllinien, die sich aus primären hepatischen Sternzellen (HSZ) als Effektorzellen der Leberfibrose herleiten, dienen dazu, die durch HCV induzierten fibrogenen Effekte näher zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um die moderat aktivierte hepatische Sternzelllinie CFSC-2G sowie die voll aktivierte Zelllinie HSC-T6 (Gabe von Prof. M. Rojkind bzw. Prof. S.L. Friedman, USA). Zusätzlich verfügen wir über eine Kooperation mit Prof. Pinzani (Universität Florenz; Italien) über humane HSZ/MF. Humane HSZ/MF und CFSC-2G lassen sich durch TGF $\beta$ 1 zu vermehrter Matrixsynthese stimulieren, während HSC-T6 weniger aktivierbar sind.

## Planung, Ablauf und Arbeitsprogramm

### I. *In vitro* Untersuchungen am Zellsystem

Die folgenden HCV-Gene exprimierende Zelllinien (Huh-7 Klone) sowie rekombinante HCV-Proteine werden in Kombination mit Kulturen hepatischer Sternzellen/Myofibroblasten zur Untersuchungen der HCV-induzierten Leberfibrose eingesetzt. Die Fragestellung, welche HCV-Proteine über welche Mediatoren für die Fibrose-Initiierung und -perpetuation verantwortlich sind, sollte dadurch zu beantworten sein.

#### A) HCV-exprimierende Zelllinien

- Huh-7 Zellen (humane Hepatomzelllinie), welche die nicht-strukturellen HCV-Gene NS3, NS4, NS5A und NS5B (Genotyp 1b) stabil, jedoch nicht regulierbar exprimieren. Als Kontrolle dienen scheintransfizierte Huh-7 Zellen. Diese Zellen stehen uns durch Kooperation mit Dr. R. Bartenschlager (Mainz) zur Verfügung. Konditionierte Überstände von Zellen, welche den gesamten viralen Leserahmen exprimieren, stehen uns durch diese Kooperation ebenfalls zur Verfügung.
- Herstellung von Huh-7 Zellen, welche stabil einzelne HCV-Gene exprimieren (pIRES2-EGFP, Clontech: Vektor mit CMV-Promoter und bicistronischer Expression von ‚green fluorescent protein‘ und dem Zielgen). Diese sind insbesondere die für das Strukturprotein codierenden Gene Core, sowie die nicht-strukturellen NS3-, NS3/NS4A-, NS4-, NS5A-Gene.

B) Weiterhin sollen Kokulturen mit der Makrophagenzelllinie NR8383 sowie Kupferzellen und Huh-7 Cytochrom P450 E2 durchgeführt werden, um deren Einfluß auf die Fibroseprogression charakterisieren zu können.

#### C) Effektorzellen

- Hepatische Sternzellen/Myofibroblasten (primäre HSZ der Ratte und vom Mensch; CFSC-2G, humane HSZ/MF) unter dem Einfluß konditionierter Medien der HCV exprimierenden Zelllinien
- Hepatische Sternzellen/Myofibroblasten in Kokultur mit HCV-transfizierten Huh-7 Zellen

- Hepatische Sternzellen/Myofibroblasten unter dem Einfluß einzelner aufgereinigter HCV-Proteine, die durch Kooperation oder kommerziell erhältlich sind.

#### D) Isolierung primärer Leberzellen

- Sternzellen und Kupfferzellen aus Rattenlebern: *in situ* Pronase-Kollagenase-Verdau mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation über Nycodenz. Hepatische Sternzellen können damit aus Banden mit einer Dichte von 6-8% ohne größere Verunreinigungen isoliert werden. Kupffer- und Endothelzellen finden sich in den Banden mit höherer Dichte. Anschließend werden die so gewonnenen primären hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen weiter kultiviert.

#### E) Messung der profibrogenen Effekte und Faktoren

- Messung der Proliferation: Bestimmung der Zellzahl nach Trypsinisierung in der Zählkammer bzw. im Coulter Counter. Quantifizierung der DNS-Synthese (Bromdeoxyuridin- und <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Einbau) und der Apoptose (TUNEL-Methode, Kernfärbung, DNS-Anfärbung mit Propidiumiodid und anschließender Messung im FACS, „Cell Death Detection“ ELISA).
- Messung der mRNA Expression Fibrose-assoziiierter Matrixgene und fibrogener Mediatoren aus den wie o.a. behandelten HSZ/MF: Prokollagen I, III und IV, MMP-1/2/3/9/12/13/14, TIMP-1/2, TGFβ1, CTGF, PDGF-AA/BB, TIMP 1/2) mittels quantitativer PCR (LightCycler). Desweiteren soll z.T. die Expression Fibrose-assoziiierter Matrixproteine (Prokollagen III und IV, MMP-1/2/3/13/14; TIMP-1/2, TGFβ1, PDGF-AA/BB) im Zelllysate mittels quantitativem Western-Blot in Relation zu β-Aktin oder im Zellüberstand mittels ELISA nachgewiesen werden.
- Der oder die Faktoren, welche die Proliferation oder Matrixsynthese der Sternzellen fördern, sollen über chromatographische Methoden oder blockierende Antikörper für bekannte Faktoren, z.B. TGFβ1, CTGF, PDGF-AA und PDGF-BB, näher eingegrenzt bzw. über proteinbiochemische Methoden aufgereinigt werden. Eventuell kommt auch die Genarray-Methode für das

Ratten (Maus)-bzw. humane Genom zum Einsatz (kommerziell erhältlich; gezielte Arrays: Zytokine, Apoptose etc.).

- Charakterisierung der sich an die TGF $\beta$ -Signaltransduktion anschließenden Reaktionskaskaden. Messung des Einflusses von NF $\kappa$ B, p38 MAPK sowie weiterer Kinasen durch kommerziell erhältliche bzw. in unserem Labor bereits etablierte Assays und geeigneter Antikörper (Popov et al.; zur Veröffentlichung eingereicht).
- Charakterisierung des Einflusses von Makrophagen/Kupfferzellen, Alkohol und des pro-oxidativen Enzyms Cytochrom P450 auf die Geninduktion in Replicon-Zellen (Kooperation mit Dr. A. Cederbaum, New York), daran anschließend Quantifizierung Fibrose-assoziiierter Gene mittels Echtzeit-PCR (LightCycler) und ELISA (s.o.). Bestimmung des oxidativen Stresses mittels Malondialdehyd und TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).

### **Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Weltweit leiden ca. 200 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion, wovon etwa 30% im Mittel nach 20-25 Jahren eine Leberzirrhose entwickeln. Patienten mit HCV-Zirrhose erleben mit einer jährlichen Rate von 5-10% eine hepatische Dekompensation (Aszites, Ösophagusvarizenblutung, Enzephalopathie), ihr Risiko für die Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms ist ca. 200-fach erhöht. Die beste verfügbare Therapie (Interferon und Ribavirin) ist teuer und nebenwirkungsreich und führt nur in ca. 50% der Patienten zur Viruselimination (1). Unklar ist, warum die HCV-Infektion im Gegensatz zu einer HBV-Infektion, nur mit einer geringen entzündlichen Aktivität einhergeht aber bei einem Grossteil der Patienten zur Zirrhose führt. Es werden daher besondere fibrogene Faktoren vermutet, die durch HCV induziert werden.

Chronische Leberschäden induzieren über eine fortgesetzte Entzündung eine dauerhafte Wundheilungsreaktion mit fortschreitende Fibrosierung des Gewebes, die in einem architektonischen Umbau mit Funktionsverlust (terminale Zirrhose) enden kann. Klassisch kommt es über die Rekrutierung mononukleärer Zellen, insbes. von Lymphozyten und Kupfferzellen/Makrophagen zur Freisetzung fibrogener Mediatoren. Als profibrogen gelten u.a. TGF $\beta$ 1, PDGF-AA, PDGF-BB und CTGF (2). Andere Faktoren, z.B. Oncostatin M, Activine oder BMPs, evtl. im Zusammenspiel

mit Hormonen und biologischen Modulatoren, z.B. Prostaglandinen, Leukotrienen, Retinoiden, werden ebenfalls vermutet. Diese induzieren eine vermehrte Proliferation und/oder Matrixgenexpression in hepatischen Sternzellen (HSZ) und Myofibroblasten (MF), welche die primären Effektorzellen der Leberfibrose darstellen. Wichtige Matrixproteine sind z.B. die Prokollagene I, III, VI, XIV, XVIII, Fibronectin, Tenascin und Laminin-2 oder -4. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen die Matrixmetalloproteinasen (MMP-1/2/3/9/13/14), welche eine Fibrolyse, d.h. die Entfernung von Matrixkomponenten, induzieren, im Falle der MMP-2 durch die Zerstörung von Basalmembranen aber eher eine profibrogene Wirkung zu haben scheinen. Die physiologischen Inhibitoren der MMPs sind TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) -1 und -2. TIMP-2 ist jedoch auch für die Aktivierung der MMP-2 über einen Komplex mit der membranständigen MMP-14 nötig. Interessanterweise können gerade die Zellen (HSZ und MF), welche in der Fibrose einen Exzess an profibrogenen Molekülen (insbes. fibrilläre Kollagene) synthetisieren, unter geeigneten Zellkulturbedingungen (durch Integrin-Signale vermittelte ‚Stress-Relaxation‘) einen fibrolytischen Phänotyp annehmen und einen Überschuss an MMPs exprimieren (2,3).

Das Hepatitis C-Virus gehört zur Familie der Flaviviridae, zu der auch die Pest- und Flaviviren gehören. Das Virus ist von einer Hülle umgeben, die einen positiven, einzelsträngigen RNA-Strang umgibt. Das RNA Genom codiert für einen einzelnen, offenen Leserahmen, der am 5'- und 3'-Ende jeweils von einem nichttranslatierten Bereich flankiert wird. Das HCV-Genom ist circa 9,6 kb lang. Das Polyprotein ist 3010 – 3033 Aminosäuren groß und wird durch eine noch undefinierte Wirtszell-Proteinase und die Virusproteasen, die durch NS2-3 und NS3 codiert werden, in die einzelnen, funktionellen Proteine gespalten. Der N-terminale Bereich des HCV-Genoms codiert hierbei für die strukturellen Proteine, während die nicht-strukturellen Gene C-terminal liegen (4).

Es gibt Hinweise darauf, daß das Virus nicht nur in Hepatozyten, sondern gering auch in Lymphozyten und anderen Nichtparenchymzellen (Monozyten/Makrophagen/Kupfferzellen, Lymphozyten) replizieren kann (5), aber auch eine direkte Aufnahme viraler Gene durch HSZ wird diskutiert (6). Jedoch sprechen die bisherigen Untersuchungen zur Expression des HCV *in vivo* mit den Techniken der *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie dagegen (7-9). Für die Aufnahme des HCV in die Hepatozyten scheint neben dem Tetraspanin CD81 auch

eine Bindung an den LDL-Rezeptor über eine Assoziation mit beta-Lipoproteinen involviert zu sein (10). Anders als z.B. bei der chronischen Hepatitis B oder der Autoimmunhepatitis ist die chronische Hepatitis C durch eine atypische und geringe Entzündung charakterisiert, die nicht oder nur wenig mit der Fibroseprogression korreliert. Es werden daher besondere fibrogene Mechanismen vermutet, bei denen es über Faktoren, freigesetzt aus infizierten Zellen (insbesondere Hepatozyten, Lymphozyten und Makrophagen/Kupfferzellen) oder über endozytierte Virusproteine, zu einer dauerhaften Aktivierung der HSZ kommt.

## Literatur

1. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol.* 2001 May;34(5):730-9.
2. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10 Suppl 1:S59-67. Review.
3. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250.
4. Bartenschlager R, Lohmann V (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81:1631-48.
5. Kato N, Ikeda M, Sugiyama K, Mizutani T, Tanaka T, Shimotohno K (1998). Hepatitis C virus population dynamics in human lymphocytes and hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 79:1859-69.
6. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2004 Feb;126(2):529-40.
7. Cho SW, Hwang SG, Han DC, Jin SY, Lee MS, Shim CS, Lee DW, Lee HB (1996). In situ detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue using a digoxigenin-labeled probe created during a polymerase chain reaction. *J Med Virol* 48: 227-33.
8. Nouri Aria KT, Sallie R, Sangar D, Alexander GJ, Smith H, Byrne J, Portman B, Eddleston AL, Williams R (1993). Detection of genomic and intermediate

- replicative strands of hepatitis C virus in liver tissue by in situ hybridization. *J Clin Invest* 91:2226-34.
9. 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: 938-941.
  10. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12766-771.

## **Erzielte Ergebnisse**

Es erfolgt der Einsatz von humanen und Ratten-Zelllinien, die sich von HSZ ableiten (gering aktiviert: CFSC-2G der Ratte, humane HSZ in Kooperation mit Prof. Pinzani, Florenz) als Effektorzellen der Leberfibrose. Die fibrogene Aktivierbarkeit dieser Zellen konnte nach TGF $\beta$ 1-Stimulation bestätigt werden. TGF $\beta$ 1, als zentraler profibrogener Mediator wird von der die nicht-strukturellen HCV-Genen NS3-NS5B replizierenden hepatozytären Huh-7 Zelllinie (Replicon-System) im Gegensatz zu scheintransfizierten Kontrollzellen vermehrt synthetisiert (Gen- und Proteinebene). Dies konnte mittels Echtzeit-PCR im LightCycler sowie auf Proteinebene mit Hilfe eines Bioassays gezeigt werden. Nach Inkubation mit konditionierten Medien der HCV-replizierenden Repliconzellen, nicht aber der scheintransfizierten Huh-7-Zellen, exprimieren gering aktivierte HSZ hochsignifikant mehr profibrogene Effektormoleküle (Prokollagen I und III, CTGF, TIMP-1 und MMP-2), während die fibrolytische Kollagenase MMP-13 herunterreguliert wird. Dies konnte ebenfalls mittels quantitativer PCR gezeigt werden. MMP-2 und MMP-13 sowie TIMP-1 spezifische ELISA's spiegelten diese Ergebnisse auch auf Proteinebene wieder. Diese Effekte konnten nicht bei voll aktivierten HSZ (HSC-T6) beobachtet werden. Auch Kokulturen mit lymphatischen Zell-Linien (B- und T-Lymphozyten) zeigten keinerlei Effekte auf die Expression Fibrose-assoziiierter Matrixgene. Die Inkubation der Replicon- bzw. scheintransfizierten Huh-7 Zellen mit konditionierten Medien einer Makrophagenzelllinie (NR8383) steigert die TGF $\beta$ 1-mRNA-Produktion der Repliconzellen im Vergleich zu Repliconzellen ohne konditioniertes Medium sowie scheintransfizierten Kontrollzellen. Neben TGF $\beta$ 1 zeigt auch das CTGF, als weiteres profibrogenes Cytokin bzw. das TNF $\alpha$  in diesem Ansatz einen signifikanten

Anstieg. Die Inkubation von HSZ mit konditionierten Medien einer Kokultur von Replicon- und Makrophagenzellen wird im Moment durchgeführt.

Die HCV-Repliconzellen exprimieren vermehrt TGF $\beta$ 1, während die TGF $\beta$ 1-Expression bei allen mit konditionierten Medien versetzten HSZ-Zellen unverändert bleibt. Die Quantifizierung des TGF $\beta$ 1-Gehalts der Repliconzellen wurde mittels eines Bioassay mit Minklung-Epithelzellen durchgeführt. Dieser erbrachte den Nachweis, das HCV-exprimierende Hepatozyten dieses Cytokin nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene vermehrt synthetisieren. Ferner gibt es Anhaltspunkte für weitere fibrogene Mediatoren in den konditionierten Medien, die im Moment charakterisiert werden. Darauf weisen erste Versuche mit blockierenden TGF $\beta$ 1 Antikörpern hin. Die Herstellung von Huh-7-Zelllinien, welche stabil einzelne, ausgewählte HCV-Gene (Core, NS3, NS3-4A, NS5B) exprimieren, ist fast abgeschlossen. Hier soll nach Zusatz der konditionierten Medien die Proliferation, DNS-Synthese und Apoptose an den Effektorzellen der Fibrose (CFSC-2G, humane HSZ/MF, primäre HSZ aus Mensch und Ratte) gemessen werden. Darüberhinaus wird die Expression Fibrose-assoziiierter Matrixgene und Mediatoren mittels Echtzeit-PCR und ELISA überprüft. Zudem kommen blockierende Antikörper gegen profibrogene Faktoren, z.B. anti-TGF $\beta$ 1, PDGF, Onkostatin M und IGF-I zum Einsatz. Die Verwendung eines TGF $\beta$ 1 blockierenden Antikörpers zeigt, daß neben TGF $\beta$ 1 noch andere fibrogene Mediatoren an der HCV-induzierten Leberfibrose beteiligt sind. Diese sollen, falls über Blockierung nicht identifizierbar, ggf. isoliert werden und über MALDI-TOF und den parallelen Einsatz von Genexpressions-Chips identifiziert werden. Desweiteren soll die Interaktionen profibrogener HCV-Proteine mit hepatozytären Proteinen und der durch sie modulierten Signaltransduktion primär durch Western Blots mit (phospho-) spezifischen Antikörpern untersucht werden.

### **Verwertung der Ergebnisse**

Das Projekt ist sowohl medizinisch als auch grundlagenwissenschaftlich orientiert. Damit leistet es einen Beitrag zum Förderziel einer Qualitätsverbesserung und einer Erhöhung der Patente an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg. Ziel ist es, Kenntnisse über die Mechanismen der Fibroseprogression bei chronischer Hepatitis C zu erlangen. Die Entwicklung effektiver und spezifischer, damit

nebenwirkungsarmer antifibrotischer Therapien baut auf dem erhaltenen Grundlagenwissen auf. Inzwischen konnten sowohl erste durch HCV-induzierte fibrogene Mediatoren als auch Mechanismen der Fibrose in vitro identifiziert werden. Da weltweit mehr als 200 Millionen Menschen an einer chronischen HCV-Infektion leiden, und ca. ein Drittel im Mittel 20 Jahre nach Infektion eine Zirrhose entwickelt, ist neben der klinischen auch die wirtschaftliche Relevanz gegeben.

Die chronische Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ist erheblicher klinischer und wissenschaftlicher Relevanz, da weltweit ca. 200 Mio. Menschen an dieser Krankheit leiden und ca. ein Drittel der Patienten im Mittel nach 20 Jahren eine Zirrhose entwickelt, mit dem inhärenten Risiko der hepatischen Dekompensation und der Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms (Inzidenz 5-7% bzw. 2-4%). Hepatische Sternzellen und vaskuläre Fibroblasten sind hierbei die primären Effektorzellen der Leberfibrose, welche bei der HCV-Infektion durch eine atypische entzündliche Aktivität charakterisiert ist, die nur wenig mit der Fibroseprogression korreliert. Es werden daher besondere fibrogene Faktoren vermutet, die durch HCV induziert werden. Diese Zellen wandeln sich hierbei in myofibroblastoide Zellen mit gesteigerter Proliferation und Matrixgenexpression um. Eine genaue Kenntnis der durch HCV-induzierten profibrogenen Mechanismen und Mediatoren ist zwingend erforderlich, um eine effektive und gezielte Fibrosehemmung nach HCV-Infektion einzusetzen. Erste durch HCV-induzierte fibrogene Mediatoren, als auch Mechanismen der Fibrose konnten bis jetzt in vitro identifiziert werden. So scheint neben dem Cytokin TGF $\beta$ 1 auch anderen fibrogenen Mediator eine zentrale Stellung zuzukommen. Da die notwendigen in vitro und in vivo Systeme zur Untersuchung der HCV-induzierten Fibrosemechanismen in einzigartiger Weise im Labor zur Verfügung stehen, ist mit guten wissenschaftlichen Erfolgsaussichten zu rechnen.

Die hohe Anzahl an Hepatitis C erkrankter Personen macht eine effektive Therapie für die bislang nicht kurativ behandelbare Leberfibrose und -zirrhose notwendig. Sich aus den Ergebnissen ableitende Erkenntnisse haben bereits ihre Patentfähigkeit erwiesen (s.u.).

## Patente

1. Kreutzer R, Limmer S, Schuppan D, John M, Bauer M, inventors; Ribopharma, Kulmbach, Germany / Alnylam, Cambridge, MA, USA, assignee. Drug for treating a fibrotic disease through RNA interference. Worldwide patent PCT WO 03/035083 A1. 2003 May 1.
2. Krebs A, Schuppan D, Limmer S, Kreutzer R., inventors; Ribopharma, Kulmbach, Germany / Alnylam, Cambridge, MA, USA, assignee. Use of a double strand ribonucleic acid for treating an infection with a positive strand RNA virus. Worldwide patent PCT WO 03/035876 A1. 2003 May 1.

## Übersichtsartikel

1. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG (2003). Hepatitis C and liver fibrosis. Review. *Cell Death Differ.* 10 Suppl 1:S59-67.

## Originalarbeiten

1. Hellemans K, Verbuyst P, Quartier E, Schuit F, Rombouts K, Chandraratna RA, Schuppan D, Geerts A. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology.* 2004 Jan;39(1):97-108.
2. Rombouts K, Kisanga E, Hellemans K, Wielant A, Schuppan D, Geerts A (2003). Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 38: 564-72.
3. Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez-Rosales JA, Schuppan D, Greenwel P, Rojkind M (2003). Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* 162:1771-80.
4. Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H (2003). Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br. J. Cancer* 88: 733-9.

5. Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, Bartenschlager R, Lohmann V, Pinzani M and Schuppan D. Hepatitis C Virus relicating hepatocytes promote hepatic stellate cell activation and fibrogenesis, *Gastroenterology*, in press.
6. Popov Y, Patsenker E, Bauer M, Schulze-Krebs A, Niedibitek E, Schuppan D Halofuginone Induces Matrix Metalloproteinases in Rat Hepatic Stellate Cells via Activation of p38 and NFkB; *JBC*, eingereicht Nov. 2004