

Abschlussbericht Teilprojekt 12.1

Projekttitlel: Charakterisierung viraler Genomsequenzen als potentielle Responsfaktoren in Verbindung mit der Interferon-alpha-Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

Projektleiter1: PD Dr. Med. T. Berg
Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik m.S. Hepatologie und Gastroenterologie; Universitätsmedizin Berlin
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Projektleiter2: Prof. Dr. med. E. Schreier
Robert-Koch-Institut
Molekulare Virologie
Nordufer 20
13353 Berlin

Telefon1: +49(0) 30-450 553071

Telefon1: +49(0) 1888-754 2379

Fax1: +49(0) 30-450 553 903

Fax2: +49(0) 1888-754-2328

E-Mail1: thomas.berg@charite.de

E-Mail2: schreiere@rki.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

Zusammenfassung

Das Kooperationsprojekt 12.1 der Charité, Campus Virchow-Klinikum und des Robert Koch-Instituts untersucht den Einfluss potentieller virusgenomischer Resistenzfaktoren bei der antiviralen Therapie der chronischen Hepatitis C. Die aktuelle Standard-Therapie zur Behandlung der chronischen Hepatitis C ist die Gabe von Interferon-alpha (IFNa) in Kombination mit Ribavirin, die in der Regel 6 Monate (bei Genotyp 2- oder 3 -Infizierten) bzw. ca. 1 Jahr (bei Genotyp 1 -Infizierten) beträgt. Der Erfolg dieser Therapie wird ganz wesentlich durch den HCV-Genotyp bestimmt. So lassen sich HCV Genotyp 2- und 3- Infizierte wesentlich effektiver therapieren, als Genotyp 1-Infizierte. Das prinzipielle Ziel dieses Vorhabens besteht darin, auf molekularer Ebene zu klären, was den unterschiedlichen Erfolg dieser antiviralen Therapie bestimmt. Dabei interessiert insbesondere, inwieweit Genom/Proteinsequenzen ("motifs") z.B. des NS 5 A- Proteins des Hepatitis C -Virus für die Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber IFNa verantwortlich sind.

Die bisherigen Ergebnisse zu unseren Untersuchungen der funktionellen Relevanz des HCV-NS5A Proteins als potentieller Vermittler der Interferonresistenz wurden in enger Kooperation mit der Charité, Campus Virchow-Klinikum im Robert Koch-Institut durchgeführt und die entsprechenden Ergebnisse des Projekts sind im Abschlußbericht dargestellt.

Ein weiterer Schwerpunkt unseres Projekts war die Charakterisierung potentieller Wirts- bzw. Virus-spezifischer Responsefaktoren mit dem Ziel einer verbesserten, auf die individuellen Erfordernisse des Patienten angepassten Behandlungsstrategie. Wie in den Ergebnissen im Einzelnen aufgeführt, konnten wir mehrere deutsche Multizenter-Studien innerhalb des HepNet initiieren mit dem Ziel der Optimierung der therapeutischen Effektivität und Verträglichkeit. Basierend auf den Studiendaten war es möglich unabhängige prognostische Faktoren zu definieren und aufgrund der viralen Kinetikanalysen auch frühzeitige Therapieabbruchkriterien zu etablieren. Ein „HCV-Response-Calculator“ wurde entwickelt und steht sowohl Ärzten wie auch Patienten über die Internetseiten des HepNet zur Verfügung. Im Rahmen des Projekts konnte eine umfassende Datenbank, sowie Serum-, DNA- und Gewebe-Bank erstellt werden. Die Daten-, Serum- und DNA-Bank umfasst inzwischen mehr als 3000 Patienten und steht auch den anderen Einrichtungen des Core-Projekts Prognosefaktoren und Resistenz zur Verfügung. Verschiedene genetische Polymorphismen, die eine Bedeutung für das Therapieansprechen bei

Patienten mit chronischer Hepatitis C haben könnten wurden untersucht und zum Teil bereits publiziert. Die genetischen Untersuchungen erfolgen auch in Zukunft in enger Kooperation mit anderen Mitgliedern des HepNet (Prof. Spengler, Bonn, PD Dr. Lammert, Aachen; Dr. Hinrichsen, Kiel und Prof. W. Siffert, Essen). Diese Untersuchungen könnten in Zukunft die Grundlage individueller Therapiestrategien darstellen. Das würde bedeuten, dass Patienten mit ungünstigen Virus- bzw. Wirtsgenetischen Markern eine andere Therapie erhalten als Patienten, bei denen ein gutes Ansprechen vorhergesagt werden kann. Auch dieser Ansatz muss in klinischen Studien prospektiv geprüft werden.

Eingehende Darstellung:

Ergebnisse

1. Initiierung klinischer Studien

Folgenden Studien wurden im Rahmen des Hep-Net unter unserer Leitung initiiert und durch das HepNet „Study House“ zertifiziert.

1.1. Titel: Individuell adaptierte Therapiestrategie mit PEG-Interferon-alfa-2b plus Ribavirin in Abhängigkeit von der Virusdynamik unter Therapie bei Patienten mit HCV-Genotyp 1-positiver chronischer Hepatitis C.

Hierbei handelt es sich um eine randomisierte multizentrische, offene Parallelgruppenstudie zur Individualisierung der Therapie der chronischen Hepatitis C wurde im Februar 2002 initiiert.

Im Rahmen dieser Studie soll untersucht werden, ob anhand der Dynamik der Hepatitis C- Virämie unter einer Standard-Kombinationstherapie mit PEG-IFNa-2b plus Ribavirin die Therapiedauer individuell festgelegt werden kann. Die Therapiedauer wird dabei umso kürzer, je schneller die HCV-RNA im Serum unter Therapie negativ wird. Die Therapiedauer richtet sich nach dem Zeitpunkt, an dem die Patienten erstmals unter Therapie HCV-RNA negativ werden. Zur Ermittlung der Therapiedauer wird die Zeitspanne bis zum Erreichen eines negativen HCV-RNA-

Tests mit dem Faktor 6 multipliziert (Beispiel: Patient ist zur Woche 4 HCV-RNA negativ geworden, dann beträgt die Therapiedauer: $4 \times 6 = 24$ Wochen). Die minimale Therapiedauer soll jedoch 18 Wochen nicht unterschreiten. In diesem Protokoll wurden ausschließlich HCV-Genotyp 1-infizierte Patienten eingeschlossen und vor Therapiebeginn in 2 Arme randomisiert (A: Standardtherapie; B: individualisierte Therapie).

Eine solche individualisierte Therapieform würde wesentlich dazu beitragen die Verträglichkeit der Behandlung zu verbessern und die Therapiekosten zu senken. Die engmaschig erhobenen Daten zur Viruskinetik unter Therapie (wöchentliche Bestimmung der HCV-RNA) erlauben zudem eine Feincharakterisierung der virologischen Response, die wiederum eine wesentliche Voraussetzung für die virusgenomischen Resistenzfaktoren-Analysen darstellt.

Verantwortlicher Leiter des Vorhabens (LKP nach AMG §40): PD Dr. med. T. Berg, Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin

An dieser Studie sind 19 Zentren beteiligt; davon 15 Universitäts-Kliniken (inklusive den core Projekten 7 (Prof. Zeuzem), 9 (Dr. Hinrichsen), 10 (Prof. Pape) (Prof. Spengler, Bonn, Prof. Rasenack Freiburg; Dr. Kallinowski, Heidelberg; Dr. Buggisch, Hamburg; Prof. Schmidt, Bochum. PD Dr. Klinker, Würzburg. Dr. Lafrenz, Rostock, Dr. Gelbmann Univ. Regensburg, Prof. Goeser, Köln), sowie städtische Krankenhäuser und Schwerpunktpraxen (Dr. Möller, Berlin, Dr. Mauss, Düsseldorf). Im Rahmen dieser Studie wurde zusätzlich in Kooperation mit Prof. Siffert, Essen, eine DNA-Bank erstellt. Ein entsprechender Ethikantrag wurde von der Ethik-Kommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin, sowie den anderen beteiligten Zentren positiv beurteilt.

Aktueller Stand: Die Rekrutierung der Studie ist wie geplant abgeschlossen. Es sind 438 Patienten in die Studie aufgenommen worden (geplante Fallzahl 438 Patienten). Das Ende der Studie („last patient out“) ist im Juli 2005.

1.2. Titel: Vergleich der Wirksamkeit einer Behandlung der HCV-Genotyp-1- positiven chronischen Hepatitis C mit pegyliertem Interferon-alpha-2a kombiniert mit Ribavirin

für 48 oder 72 Wochen bei unvorbehandelten Patienten. Eine multizentrische Phase-III-Studie mit einem offenen, randomisierten, aktiv kontrollierten Parallelgruppen-Design.

Hauptziel der vorliegenden Studie ist die Überprüfung der Wirksamkeit einer Kombinationstherapie von pegyliertem Interferon-alpha-2a (PEG-IFN) plus Ribavirin für 48 Wochen im Vergleich zu einer 72-wöchigen Kombinationstherapie bei einer bisher unbehandelten Patientengruppe mit HCV-Genotyp-1-induzierter chronischer Hepatitis C.

Verantwortlicher Leiter des Vorhabens (LKP nach AMG §40): PD Dr. med. T. Berg, Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin.

An dieser Studie sind 17 Zentren beteiligt; davon 16 Universitäts-Kliniken (inklusive den core Projekten 7 (Prof. Zeuzem), 9 (Dr. Hinrichsen), 10 (Prof. Pape) (Prof. Spengler, Prof. Rasenack Freiburg; Dr. Kallinowski, Heidelberg; Dr. Buggisch, Hamburg; Prof. Schmidt, Bochum. PD Dr. Klinker, Würzburg; Dr. Prof. Goeser, Köln; Prof. Gerken, Essen, Dr. Weidenbach, Ulm, Dr. Heintges, Düsseldorf, Prof. Porst, Dresden, Prof Ramadori, Göttingen, Dr. Wiese, Leipzig), sowie ein städtisches Krankenhaus.

Aktueller Stand: Die Rekrutierung der Studie ist abgeschlossen und die geplante Fallzahl von 458 Patienten wurde erreicht. Die Ergebnisse der Studie wurden bereits als Abstract auf der AALSD 2004 präsentiert. Ein Manuskript ist in Vorbereitung. Die Daten der Studie zeigen, dass Patienten mit langsamer virologischer Response von einer Verlängerung der Therapiedauer profitieren. Die Ergebnisse dieser Studie haben bereits jetzt Bedeutung für das Management von Patienten unter antiviraler Kombinationstherapie

Berg T, v.Wagner M, Hinrichsen H, Heintges T, Buggisch P, Goeser T, Rasenack J, Pape G, Schmidt W, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Alshuth U, Zeuzem S. Reduction of the relative relaps rate by prolongation of a therapy with PegInterferon alfa-2a plus Ribavirin in Patients with genotype 1 infection up to 72 weeks. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 238A.

1.3. Titel: Escitalopram for the prevention of PEG-interferon associated depression (CIPPAD-Studie). A placebo controlled study. (LKP Schäfer/Berg)

Eine Hauptnebenwirkung der Interferon-alpha-Therapie ist die Induktion von Depressionen oder anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen. Diese Nebenwirkungen führen oft zum vorzeitigen Therapieabbruch. Im Hinblick auf die Wichtigkeit der Therapieadhärenz für die Induktion einer anhaltenden virologischen Response, sind diese Nebenwirkungen ein wesentliches Problem, da sie die Chance der Heilung der chronischen Hepatitis C beeinflussen können. Die Rationale dieser Studie leitet sich aus unseren früheren Untersuchungen ab, die gezeigt haben, dass auch Patienten ohne psychiatrische Vorerkrankungen in über 50% Depressionen unter Interferon-Therapie entwickeln und dass eine präemptive Therapie mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern die Entwicklung von Depressionen reduzieren kann

Schaefer M, Schwaiger M, Berg T. Citalopram for prevention of interferon-alpha associated depression in psychiatric risk patients. *Hepatology* 2003; 38 (Suppl.1): 320A.

Das Hauptziel der Studie ist die Verbesserung der Verträglichkeit der antiviralen Therapie. Eine bessere Verträglichkeit könnte zusätzlich einen Faktor darstellen, der zu einer verbesserten Wirksamkeit beiträgt. Außerdem werden im Rahmen des Projekts Risikofaktoren für die Entwicklung von Interferon-induzierten Depressionen einschließlich genetischer Polymorphismen im 5-HTT Gen erhoben. Die Studie hat im Januar begonnen. 22 Zentren sind an der Durchführung der Studie beteiligt. Im Rahmen der im HepNet geplanten besseren vertikalen Vernetzung ist es gelungen 11 Schwerpunktpraxen an dem Studienprojekt zu beteiligen. Inzwischen sind 76 der geplanten 200 Patienten randomisiert.

2. Generierung einer Datenbank zur Erstellung von Guidelines zum Therapie-Management von Patienten mit chronischer Virushepatitis

Eine Datenbank der Patienten, die im Rahmen der prospektiven HepNet-zertifizierten Studien eine antivirale Therapie erhalten hatten wurde generiert. Diese Datenbank umfasst alle relevanten klinischen, laborchemischen, histologischen, virologischen und antiviralen Response-Daten. Ziel der Datenbank ist es prädiktive Parameter für die Therapieresponse zu entwickeln sowie Algorithmen zum Therapiemanagement. Inzwischen umfasst die Datenbank mehr als 1500 Patienten mit chronischer Virushepatitis.

2.1. Etablierung eines online Response-Calculators: Eine erste Analyse von 260 Patienten der Zentren Frankfurt (Homburg), München, Kiel und Berlin wurde 2003 in Hepatology publiziert (siehe Literaturliste). Diese Daten dienten als Grundlage für die Entwicklung des so genannten „Response-Calculators“, der es Arzt und Patient erlaubt die individuelle Prognose hinsichtlich der zu erwartenden Therapieresponse online anhand weniger signifikanter Parameter zu berechnen. Der Response Calculator ist auf der Homepage des HepNet installiert.

2.2. GGT als wichtigster Prädiktor der Therapieresponse bei HCV-Genotyp 1: Die Bedeutung einer erhöhten GGT als ungünstigen prognostischen Parameter hatten wir bereits in früheren Untersuchungen gezeigt. Eine erneute Datenbank-Analyse von über 900 Patienten bestätigt, dass die GGT den wichtigsten unabhängigen Parameter für die Therapieresponse darstellt und somit hilft HCV-Typ 1 infizierte Patienten mit günstiger und ungünstiger Prognose zu erkennen. Diese Daten wurde auf der AASLD 2004 in Boston präsentiert und stellen eine Grundlage für neue Therapiekonzepte dar. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.

Weich V, Herrmann E, Sarrazin C, Hinrichsen H, Buggisch P, Gerlach T, Klinker H, Spengler U, Bergk A, Wiedenmann B, Zeuzem S, Berg T. Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) is the most reliable predictive single parameter for treatment outcome in HCV type 1-infected patients. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 333A.

2.3. Bedeutung der Ribavirindosis: Die Bedeutung einer optimalen Dosierung der antiviralen Medikation tritt zunehmend in das Bewusstsein der behandelnden Ärzte. Insbesondere eine Optimierung der Ribavirindosis könnte zu einer weiteren Steigerung der anhaltenden Remissionsraten führen. Nach Analyse von 343 Patienten der Datenbank (Patienten einer deutschen Multizenterstudie: Berg et al, Hepatology 2003, 37, 1359-1367) konnten wir mittels ROC-Analyse einen Grenzwert für die Ribavirindosierung von 13.75 mg/kg KG ermitteln, der nach Möglichkeit nicht unterschritten werden sollte. Die anhaltenden Remissionsraten lagen bei 63% bei Patienten mit einer Ribavirindosis > 13.75 mg/kg im Vergleich zu 44% wenn die Ribavirindosis \leq 13.75 mg/kg am Therapieende betrug (odds ratio 2.2; 95 % CI 1.4-3.4; $p=0.001$). Diese Daten wurden auf der AASLD 2003 in Boston präsentiert ein Manuskript befindet sich in Vorbereitung.

Herrmann E, Berg T, Hinrichsen H, Gerlach T, Spengler U, Goeser T, Zeuzem S. Importance of ribavirin dosage on virological response rates in patients chronically infected with hepatitis C virus and treated with interferon-based combination therapy. Hepatology 2003; 38 (Suppl.1): 298A.

2.4. Nicht-invasive Fibrosediagnostik. Der Stellenwert der Leberhistologie zur Beurteilung der Krankheitsaktivität und Fibrorestadium wird kontrovers diskutiert. Aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse der Leberbiopsie werden zunehmend nicht-invasive Tests zur Bestimmung des Fibrorestadium eingesetzt. Ein einfacher Test zur Abschätzung der Fibroseaktivität (APRI score = AST to Platelet Ratio) wurde kürzlich von Wong et al. publiziert. Die Übertragbarkeit solcher Daten und Test ist a priori schwer nachzuvollziehen. Anhand der Informationen unserer Datenbank konnten wir jedoch zeigen, dass der APRI score hilfreich ist um eine Abschätzung des Fibrorestadiums zu ermitteln und man dadurch in ca. 50% der Patienten auf eine Leberbiopsie verzichten kann. Diese Ergebnisse wurden in Hepatology 2004 publiziert.

3. Bedeutung genetischer Polymorphismen für den Verlauf und die Therapieresponse bei chronischer Virushepatitis

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, wie z.B. Hämochromatose oder α 1-Antitrypsin-Mangel, 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.

Die Grundlage der Untersuchungen stellt unsere (weltweit größte) DNA-Bank von über 3000 Patienten mit Lebererkrankungen dar (davon ca. 1500 Patienten mit chronischer Virushepatitis). Zudem werden die relevanten klinischen Daten in einem umfangreichen Datenbanksystem erfasst. Eine Erweiterung der genetischen Analysen erfolgt im Rahmen der HepNet-Vernetzung (insbesondere mit Kiel, Essen, Homburg, Aachen, Frankfurt/Main, Erlangen, Bonn, München) sowie dem Europäischen „Network of Excellence on Viral Resistance“ (VIRGIL).

An diesem Kollektiv von Patienten wurde zunächst die Bedeutung bereits bekannter Genpolymorphismen auf Entstehung, Ausprägung und Fortschreiten der Erkrankung mit der leistungsfähigen LightCycler-Technologie untersucht werden. Es wurde 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. Ein besonderer Schwerpunkt ist hier die Untersuchung der Bedeutung von genetischen Alterationen in immunregulatorischen Genen für Schweregrad und Therapieansprechen bei Hepatitis C Virus (HCV) Infektion.

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. 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. Aktuelle Analysen zeigen, dass genetische Alterationen auch mit einer beschleunigten Fibroseprogression assoziiert sein können (z. B. Angiotensinogen oder Apolipoprotein E). Kandidatengene für künftige Untersuchungen sind z. B. Mannose-Binding Lectin-2, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), RNA-abhängige Protein-Kinase (PKR), 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-1, Interferon Gamma, Interferon Gamma Rezeptor sowie Transforming Growth Factor beta und LDL-Rezeptor.

Die Ergebnisse im Einzelnen werden hier in Form der Literaturangaben dargestellt (die entsprechenden Publikationen sind dem Abschlussbericht beigelegt)

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 Δ 32 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, Muleer 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 Hep*, in press

Publikationen als Abstract:

Nattermann J, Ahlenstiel G, Feldmann G, Nischalke HD, Vogel M, Berg T, Rockstroh R, Woitas R, Sauerbruch T, Spengler U. The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene in HCV infection. *Hepatology* 2003; 38 (Suppl.1): 466A.

Halangk J, Berg T, Puhl G, Müller T, Landt O, Wiedenmann B, Neuhaus P, Luck W, Witt H. Evaluation of angiotensinogen-6G>A and M235T single nucleotide polymorphism as inherited risk factors for the progression of chronic liver disease of different etiologies. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 95.

Mueller T, Gessner R, Sarrazin C, Halangk J, Bergk A, Boemmel F van, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Apolipoprotein E Polymorphism may protect from hepatitis C virus (HCV)-infection. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 136.

Berg T, Halangk J, Puhl G, Müller T, Wiedenmann B, Neuhaus P, Luck W, Witt H.

Evaluation of alpha-1-Antitrypsin allele frequencies as an inherited risk factor for the development of chronic liver disease of different etiologies. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 163.

von Hahn T, Halangk J, Müller T, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Witt H, Berg T. Relevanz der CD14 und TLR4 Endotoxin-Rezeptor-Polymorphismen für die Entwicklung und den Schweregrad chronischer Lebererkrankungen. *Z. Gastroenterol* 2004; 42: 94.

Witt H, Halangk J, Schulz HU, Puhl G, Neuhaus P, Landt O, Müller T, Berg T. UGT1A7-Polymorphismen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom. *Z. Gastroenterol* 2004; 42: 78.

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, Gabelein 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.

4. Mutationen innerhalb der HCV NS5A Gens (ISDR) als Prädiktor der Therapieresponse

Basierend auf statistischen, nicht aber funktionelle Daten, wurde eine Region des NS5A Proteins als prognostischer Marker für den Therapie-Erfolg postuliert und als „interferon sensitivity determining domain“ ISDR bezeichnet. Die Bedeutung der Anzahl von Mutationen innerhalb der ISDR-Region wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert. Wir haben daher eine Metaanalyse anhand eines Datensatzes von 1230 ISDR Sequenzinformation HCV-genotype 1b-infizierte Patienten (hauptsächlich aus Japan und Europa) durchgeführt und mittels logistischer Regression analysiert. Die Ergebnisse der Metaanalyse wurden 2004 in *Gut* publiziert und belegen eindeutig die Relevanz der Virus-genetischen Alteration für die

Therapie-Response (im wesentlichen auf Interferon mono) sowohl in Japan als auch in Europa. Ziel weiterer Projekte ist die Bedeutung der ISDR-Mutationen für die Therapieresponse bei PEG-IFNa-Kombinationstherapie zu evaluieren. Sollten sich auch hier die Daten bestätigen, wäre eine anhand der ISDR-Region individualisierte Therapie vorstellbar.

Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, Berg T. Sustained virologic response in HCV type 1b-infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: A meta analysis focussed on geographical differences, Gut 2004; 53: 1345-1351.

Funktionelle Untersuchung des Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Proteins hinsichtlich der Interferon induzierten antiviralen Immunantwort

Zusammenfassung

Ziel unserer Untersuchungen war die Charakterisierung molekularer viraler Faktoren, die den Erfolg der antiviralen Interferon Therapie bei chronischen HCV Patienten bestimmen. Dabei interessierte insbesondere, in wie weit Genom/Proteinsequenzen ("motifs") z.B. des NS5A-Proteins für die Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber IFN-alpha verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass das NS5A im Vergleich zu bekannten Interferon-Antagonisten, wie dem NS1 des Influenza-Virus bzw. dem VP35 des Ebola-Virus, die Interferon-Beta-Produktion nur geringfügig antagonisiert. Im Vergleich dazu wurde die Interferon-induzierte ISRE-Aktivierung stark reduziert, dies stand im direkten Vergleich zu einem bekannten Inhibitor der Interferon-induzierten Signaltransduktion, dem M27-Protein des murinen Cytomegalie-Virus.

Die Untersuchungen zeigten, dass verschiedene NS5A-Klone der Genotypen 1a und 1b in der Lage waren, die Stimulierung eines ISRE-Reporters um das 27-fache zu reduzieren. Dieses konnte Dosis-abhängig in verschiedene Zelltypen gezeigt werden. Es spielte hierbei keine Rolle, ob die untersuchten NS5A-Proteine von Patienten stammten, die auf Interferon-Therapie ansprachen oder nicht. Alle untersuchten NS5As waren in der Lage die Interferon-induzierte Aktivierung von ISRE zu inhibieren.

Eine biologische Relevanz für NS5A vermittelte Interferon Antagonisierung konnte für

das delNS1-Virus, ein Interferon-sensitives, rekombinantes Influenza A Virus, gezeigt werden. NS5A war hierbei in der Lage, virales Wachstum wiederherzustellen.

Mit Hilfe von Deletions-Mutanten konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus des NS5A (AA1-238) ausreicht, IFN-vermittelte Signaltransduktion zu inhibieren. Die Deletion der putativen ISDR hatte hierbei keinen Einfluss auf die Inhibition.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch das NS5A-Protein funktional, unabhängig von der ISDR, Einfluss auf Interferon-induzierte Signaltransduktion nimmt und dass diese Eigenschaft biologisch relevant ist.

Ergebnisbericht

Hintergrund

Typ 1-Interferone, hauptsächlich Interferon-alpha und Beta, spielen eine wichtige Rolle in der initialen antiviralen Immunantwort (innate immune response). Viele Viren, vorwiegend RNA-Viren, haben verschiedene Strategien entwickelt, die Interferon-Antwort zu antagonisieren und damit der initialen Immunantwort zu entgehen.

Basierend auf statistischen, nicht aber funktionalen Daten, wurde eine Region des NS5A Proteins als prognostischer Marker für den Therapie-Erfolg postuliert und als „interferon sensitivity determining domain“ ISDR bezeichnet (Enomoto *et al.* 1996). Dies wird noch immer kontrovers diskutiert (Herion and Hoofnagle 1997; Zeuzem *et al.* 1997; Pascu *et al.* 2004).

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung molekularer viraler Faktoren, die den Erfolg der antiviralen Interferon-Therapie bei chronischen HCV-Patienten bestimmen. Dabei interessierte insbesondere, inwieweit Genom/Proteinsequenzen ("motifs") z.B. des NS5A-Proteins für die Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber IFN-alpha verantwortlich sind.

Voraussetzungen

Als Grundlage zur molekularen Charakterisierung dienten Seren von 30 Patienten des Genotyp 1, die uns im Rahmen einer klinischen Studie von unserem

Kooperationspartner PD Dr. T. Berg am Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin bereitgestellt wurden. Basierend auf Literatur-Daten wurde der Schwerpunkt zur Analyse eines potentiellen Interferon-Antagonisten zunächst auf das NS5A-Protein gelegt. Mit Hilfe der Kooperationspartner PD. Dr. T. Wolff, Berlin und Prof. H. Hengel, Düsseldorf konnten funktionale Assays, die für Influenza (Dauber *et al.* 2004) und Herpesviren (Khan *et al.* 2004) etabliert waren, für Untersuchungen zum HCV adaptiert werden.

Ergebnisse

Mit Hilfe von funktionalen Assays wurde der Einfluss von einzelnen klonalen HCV-Proteinen zunächst des NS5A-Proteins auf die Interferon-Antwort untersucht. Dazu wurde NS5A-cDNA aus 16 Patientenseren der Genotypen 1a/b und 3 (7 Sustained-Respondern und 11 Non-Respondern) amplifiziert, in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und in verschiedenen eukaryontischen Zell-Linien transient zur Expression gebracht. Von einzelnen Patienten wurden unter Berücksichtigung der Quasispeziespopulation zusätzlich differente NS5A-Proteine mit einbezogen. Insgesamt wurden 38 unterschiedliche NS5A Leserahmen kloniert und sequenziert. Die Expression der NS5A-Proteine in eukaryontischen Zellen wurde im Western-Blot mit NS5A-spezifischen monoklonalen Antikörpern bestätigt.

Zur funktionalen Charakterisierung der NS5A-Proteine wurden zwei unterschiedliche Reportersysteme eingesetzt, um Interferon-Reponse sowie Interferon-Signaling zu messen. Zur Analyse der Interferon-Response wurde ein Reporter-System (Basler *et al.* 2000) adaptiert, welches z.B. zur Charakterisierung des VP35 Proteins des Ebola-Virus eingesetzt wurde. Dazu wurden NS5A und ein IFN-beta-Reporter (p-125-Luc (Yoneyama *et al.* 1998)) transient in humane Zell-Linien transfiziert und Interferon-Response mit der Interferon-sensitiven Influenza-Rekombinante delNS1 (Garcia-Sastre *et al.* 1998) stimuliert. Nur eines der 18 im Reporter-Gen-Assay analysierten NS5As hatte die Fähigkeit, die Stimulierung des Interferon-beta Promotors signifikant zu antagonisieren. Dieser Klon war in der Lage, die Interferon-beta Induktion Dosis-abhängig um das ca. 5-7fache zu reduzieren. Alle anderen untersuchten NS5As zeigten nur eine schwache (2-3fache) bzw. keine Reduktion der Reporter-

Stimulierung und waren damit im Vergleich zu bekannten Inhibitoren der Interferon-Induktion, wie dem NS1-(Influenza A) oder dem VP35-Protein (Ebola, Reston) nicht signifikant.

Zur Analyse des Interferon-Signalings wurde ein Reporter-Assay (pISRE-Luc-Clonotech) eingesetzt, um die Induktion der Interferon-induzierten Signaltransduktions-Kaskaden zu messen. Typ I-Interferon, hauptsächlich Interferon-alpha und -beta, binden an einen spezifischen Rezeptor und induzieren die Jak-STAT Signaltransduktions-Kaskade, die zur Translokation des Transkriptionsfaktors ISGF3 (Interferon Stimulated Growth Factor 3) in den Zellkern und zur Aktivierung verschiedener Interferon-Stimulierter Gene führt. ISGF3 bindet dabei an ISRE, welches zur Aktivierung verschiedener antiviraler Gene führt, speziell der PKR (Protein-Kinase-R), des Oligoadenylat-Systems (OAS) und der Mx-Proteine. Rekombinante NS5As und der ISRE-Reporter wurden hier transient in humane Zell-Linien transfiziert und Signaling durch Zugabe von hu-IFN-beta induziert. Alle 18 untersuchten NS5A des Genotyps 1a/b sowie drei des Genotyps 3 waren in der Lage, IFN-Signaling zu antagonisieren (Reduktion der Stimulierung des Reporters zwischen zwei und 74-fach, im Schnitt 27-fach). Auch hier konnte nicht zwischen Sustained und Non-Respondern unterschieden werden. Diese Ergebnisse wurden u.a. auf humanen Leberkarzinoms Zell-Linie Huh7 reproduziert und waren vergleichbar mit dem murinen Cytomegalievirus M27-Protein, einem charakterisierten Inhibitor des Interferon-Signalings.

Zur Analyse eines putativen Motifs, welches für die Inhibition der IFN-vermittelten Signaltransduktion verantwortlich ist, wurden Mutationsanalysen durchgeführt, denen die bereits charakterisierte Bereiche, PKR-Bindende-Domäne, ISDR und V3-Region als Vorlage dienten. Hierbei zeigte sich, dass die N-terminalen 238 Aminosäuren ausreichen, IFN-induzierte Signaltransduktion zu inhibieren. Dieser Bereich umfasst unter anderem ein erst kürzlich identifiziertes Zink-Bindungsmotif (Tellinghuisen, 2004) und basale Phosphorylierungsstellen; interessanterweise enthält dieser Bereich weder die PKR-Bindende Domäne (inklusive der ISDR), noch die V3-Region. Der entsprechende C-Terminus des NS5A-Proteins (AA239-451) wies hingegen nur noch marginale IFN-antagonisierende Eigenschaften auf. Somit konnte der Bereich für die IFN-antagonisierenden Eigenschaften des NS5A-Proteins auf den N-Terminus

(AA1-238) eingegrenzt werden.

Zur Analyse einer biologischen Relevanz wurde das Interferon-sensitive, rekombinante Influenza-Virus „delNS1“ als Surrogat-Marker für Virus-Wachstum eingesetzt. Auch hier bestätigte sich, dass NS5A die antiviralen Eigenschaften von IFN antagonisieren kann. Mit Hilfe von Makro-Arrays wird derzeit untersucht, welchen Einfluss NS5A auf spezifische IFN-stimulierte Gene nimmt.

Verwertbarkeit

Da sowohl das NS3- (Lamarre *et al.* 2003), als auch das Core-Protein (Melen *et al.* 2004) die antiviralen Eigenschaften des Interferon inhibieren können, unterstreichen unsere Ergebnisse, dass das Hepatitis C-Virus verschiedene Strategien besitzt, die primäre angeborene Immunität zu umgehen. Speziell die Daten zum Rescue eines Interferon-sensitiven Virus zeigen, dass das NS5A-Protein als ein biologisch-aktiver Interferon Antagonist fungieren kann. Sowohl die Reporter-Assays, als auch das delNS1 Influenza-System bieten alternative Möglichkeiten, um über potentielle neue Therapiemodelle die Therapierbarkeit mit Interferon zu verbessern.

Kooperationspartner

PD Dr. Wolff (Robert Koch-Institut, Berlin), Prof. H. Hengel (Institut für Virologie, Düsseldorf), Prof. M. Roggendorf/PD Dr. M. Lu (Institut für Virologie, Essen), PD Dr. E. Mühlberger (Institut für Virologie, Marburg)

Literatur

- Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2000). "The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12289-94.
- Dauber, B., G. Heins and T. Wolff (2004). "The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction." *J Virol* 78(4): 1865-72.
- Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Marumo and C. Sato (1996). "Mutations in the

- nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection." *N Engl J Med* 334(2): 77-81.
- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese and T. Muster (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." *Virology* 252(2): 324-30.
- Herion, D. and J. H. Hoofnagle (1997). "The interferon sensitivity determining region: all hepatitis C virus isolates are not the same." *Hepatology* 25(3): 769-71.
- Khan, S., A. Zimmermann, M. Basler, M. Groettrup and H. Hengel (2004). "A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction." *J Virol* 78(4): 1831-42.
- Lamarre, D., P. C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D. R. Cameron, M. Cartier, M. G. Cordingley, A. M. Faucher, N. Goudreau, S. H. Kawai, G. Kukulj, L. Lagace, S. R. LaPlante, H. Narjes, M. A. Poupard, J. Rancourt, R. E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y. S. Tsantrizos, S. M. Weldon, C. L. Yong and M. Llinas-Brunet (2003). "An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus." *Nature* 426(6963): 186-9.
- Melen, K., R. Fagerlund, M. Nyqvist, P. Keskinen and I. Julkunen (2004). "Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs." *J Med Virol* 73(4): 536-47.
- Pascu, M., P. Martus, M. Hohne, B. Wiedenmann, U. Hopf, E. Schreier and T. Berg (2004). "Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences." *Gut* 53(9): 1345-51.
- Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida and T. Fujita (1998). "Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300." *Embo J* 17(4): 1087-95.
- Zeuzem, S., J. H. Lee and W. K. Roth (1997). "Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa." *Hepatology* 25(3): 740-4.

Veröffentlichungen:

- Schreier, E., D. Radun, H. Neuhauser and K. Stark (2003). Hepatitis C.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, Robert Koch-Institut.

Society for Virology, Study group "Immunobiology of Viral Infections" 2. Workshop,
Zeilitzheim, September 17–19, 2003

Anlagen: „Abstract Zeilitzheim 2003.doc“

Hep-Net Mitgliederversammlung und Symposium, Hannover,
März 05-06, 2004

Jahrestagung der "Gesellschaft für Virologie", Tübingen,
März 17–20, 2004

Anlagen: „Abstract Tübingen GfV 2004.doc“

Poster: „Poster Tübingen GfV 2004.pdf“

Society for Virology, Study group "Immunobiology of Viral Infections" 3. Workshop,
Zeilitzheim, September 15–17, 2004

Anlagen: „Abstract Zeilitzheim 2004.doc“

11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg,
Oktober 03-07, 2004

Anlagen: „Abstract Heidelberg 11th Int Symp on HCV and related Viruses.doc“

Poster: „Poster Heidelberg 11th Int Symp on HCV and related Viruses.pdf“

Literaturverzeichnis (Publikationen mit HepNet Acknowledgement)

Manuskripte

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

v. Bömmel F, Schernick A, Hopf U, Berg T. Tenofovir Disoproxil Fumarate exhibits strong antiviral effect in a patient with severe lamivudine-resistant hepatitis B reactivation. *Gastroenterology* 2003; 124: 586-7.

Berg T, Kronenberger B, Hinrichsen H, Gerlach T, Buggisch P, Herrmann E, Spengler U, Goeser T, Nasser S, Wursthorn C, Pape GR, Hopf U, Zeuzem S. Triple therapy with amantadine in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: A placebo-controlled trial. *Hepatology* 2003; 37: 1359-1367

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.

Berg T, Pascu M, Möller B. Prediction of spontaneous viral clearance in acute hepatitis C by viral load measurements, *Hepatology* 2003; 37: 1495-1496.

Teuber G, Pascu M, Berg T, Lafrenz M, Pausch J, Kullmann F, Ramadori G, Arnold R, Weidenbach H, Musch E, Junge U, Wiedmann KH, Herrmann E, Zankel M, Zeuzem S. Randomized, controlled trial with IFN-alpha combined with ribavirin with and without amantadine sulphate in non-responders with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 39: 606-613.

Berg T, Sarrazin C, Hinrichsen H, Buggisch P, Gerlach T, Zachoval R, Zeuzem S. Does noninvasive staging of fibrosis challenge liver biopsy as a gold standard in chronic hepatitis C? *Hepatology* 2004; 39: 1456-1457

Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, Berg T. Sustained virologic response in HCV type 1b-infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: A meta analysis focussed on

geographical differences, Gut 2004; 53: 1345-1351.

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 Δ 32 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.

van Bommel F, Wünsche T, Mauss S, Reinke P, Bergk A, Schürmann D, Wiedenmann B, Berg T. Comparison of Adefovir and Tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. Hepatology 2004; 40: 1421-1425.

Schäfer M, Schwaiger M, Garkisch AS, Pich M, Hinzpeter A, Uebelhack R, Heinz A, Berg T. Prevention of Interferon-alpha associated depression in psychiatric risk patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 2005, in press

Nattermann J*, Ahlenstiel G, Berg T, Muleer 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, in press

Abstracts

Herrmann E, Berg T, Hinrichsen H, Gerlach T, Spengler U, Goeser T, Zeuzem S. Importance of ribavirin dosage on virological response rates in patients chronically infected with hepatitis C virus and treated with interferon-based combination therapy. Hepatology 2003; 38 (Suppl.1): 298A.

Nattermann J, Ahlenstiel G, Feldmann G, Nischalke HD, Vogel M, Berg T, Rockstroh R, Woitas R, Sauerbruch T, Spengler U. The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene in HCV infection. Hepatology 2003; 38 (Suppl.1): 466A.

Berg T, v.Wagner M, Hinrichsen H, Heintges T, Buggisch P, Goeser T, Rasenack J, Pape G, Schmidt W, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Alshuth U, Zeuzem S. Reduction of the relative relapse rate by prolongation of a therapy with PegInterferon alfa-2a plus Ribavirin in Patients with genotype 1 infection up to 72 weeks. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 238A.

Weich V, Herrmann E, Sarrazin C, Hinrichsen H, Buggisch P, Gerlach T, Klinker H, Spengler U, Bergk A, Wiedenmann B, Zeuzem S, Berg T. Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) ist he most reliable predictive single parameter for treatment outcome in HCV type 1-infected patients. Hepatology 2004; Vol. 40, No. 4, Suppl.1: 333A.

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 fort he 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, Berg T, Puhl G, Müller T, Landt O, Wiedenmann B, Neuhaus P, Luck W, Witt H. Evaluation of angiotensinogen-6G>A and M235T single nucleotide polymorphism as inherited risk factors for the progression of chronic liver disease of different etiologies. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 95.

Mueller T, Gessner R, Sarrazin C, Halangk J, Bergk A, Boemmel F van, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Apolipoprotein E Polymorphism may protect from hepatitis C virus (HCV)-infection. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 136.

Berg T, Halangk J, Puhl G, Müller T, Wiedenmann B, Neuhaus P, Luck W, Witt H. Evaluation of alpha-1-Antitrypsin allele frequencies as an inherited risk factor for the development of chronic liver disease of different etiologies. *J Hepatol* 2004; Vol. 40, Suppl.1: 163.

von Hahn T, Halangk J, Müller T, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Witt H, Berg T. Relevanz der CD14 und TLR4 Endotoxin-Rezeptor-Polymorphismen für die Entwicklung und den Schweregrad chronischer Lebererkrankungen. *Z. Gastroenterol* 2004; 42: 94.

Witt H, Halangk J, Schulz HU, Puhl G, Neuhaus P, Landt O, Müller T, Berg T. UGT1A7-Polymorphismen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom. *Z. Gastroenterol* 2004; 42: 78.

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.