

## **Abschlussbericht Teilprojekt 15.5**

**Projekttitlel:** Identifizierung von humanen Suszeptibilitätsgenen für die Progression der Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus-Infektion

**Projektleiter1:** Prof. Dr. med. F. Lammert  
Universitätsklinikum Bonn  
Medizinische Klinik und Poliklinik I  
Sigmund-Freud-Str. 25  
53105 Bonn

**Projektleiter2:** PD Dr. med. H. E. Wasmuth  
Universitätsklinik Aachen (UKA)  
Medizinische Klinik III  
Pauwelsstraße 30  
52057 Aachen

**Telefon:** +49(0) 228 -287 5511

**Fax:** +49(0) 228-287 4698

**E-Mail:** Frank.Lammert@ukb.uni-bonn.de

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.12.2004

**Partner:**

Prof. Dr. F. Lammert (Universitätsklinikum Bonn)

PD Dr. med. H. E. Wasmuth Universitätsklinik Aachen (UKA)

PD Dr. U. Treichel (Universitätsklinikum Essen)

**I. Kurzfassung**

*Aufgabenstellung:* In diesem Projekt sollen Suszeptibilitätsgene für die Leberfibrose in murinen Modellen identifiziert und anschließend bei Patienten mit chronischer Hepatitis C getestet werden.

*Voraussetzungen:* Die erforderliche Methodik war in Vorarbeiten bereits etabliert und die erforderliche apparative Ausrüstung war vorhanden. Durch das Kompetenznetz Hepatitis wurde das Projekt durch Mittel für Sachausgaben und die Beschaffung eines Gefrierschranks gefördert.

*Planung und Ablauf:* Das Projekt wurde wie in der Vorhabensbeschreibung vorgesehen durchgeführt, konnte jedoch wegen der späteren Zuwendung der vorgesehenen Mittel erst zu Beginn des Jahres 2004 begonnen werden.

*Wissenschaftlicher und technischer Stand:* Die Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen unterliegt einer großen interindividuellen Schwankungsbreite. Neben exogenen Faktoren konnten in den letzten Jahren auch eine individuelle genetische Suszeptibilität zur Progression der Leberfibrose bei verschiedenen hepatologischen Krankheitsbildern näher charakterisiert werden [Wasmuth et al. 2003]. Eine große Problematik der bisher veröffentlichten Studien stellt hierbei die Auswahl der untersuchten Gene dar. In der Regel handelte es sich um genetische Loci, die aufgrund der Pathophysiologie der Erkrankung als Risikogene postuliert wurden. Hieraus ergibt sich zwangsläufig einer Einschränkung hinsichtlich der Auswahl der untersuchten Loci. Durch einen sogenannten „Hypothesen-freien“ Untersuchungsansatz können hingegen erstmals auch Gene identifiziert werden, die bisher nicht im Zusammenhang mit der Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen gesehen wurden. Einen solchen Ansatz bietet die tierexperimentelle „Quantitative trait locus (QTL)“-Analyse. Hierbei werden

Inzuchtmäuse mit einer hohen individuellen Suszeptibilität zur Fibrose mit Mäusen mit geringer Fibrosesuszeptibilität gekreuzt. In den Nachkommen können dann durch genomweite Analyse Loci identifiziert werden, die signifikant zum untersuchten Phänotyp beitragen [Hillebrandt et al. 2002]. Das im Start-up Fund beantragte Projekt hatte zum Ziel, die orthologen humanen Gene der in der Maus identifizierten Genloci auf ihre Bedeutung bei der Fibrogenese und dem Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zu untersuchen.

*Zusammenarbeit mit anderen Stellen:* SFB 542 (RWTH Aachen), Medizinische Nachwuchsgruppe des Landes NRW "Polygene hepatobiliäre Erkrankungen" (PD Dr. Lammert), Kompetenznetz Hepatitis Hep-Net (Arbeitsgruppen Prof. Dr. A.M. Gressner/Aachen, Prof. Dr. D. Schuppan/Erlangen, PD Dr. Hellerbrand/Regensburg, PD Dr. T. Berg/Berlin).

## **II. Eingehende Darstellung**

### *1. Ergebnisse und wissenschaftlicher Fortschritt*

Als erstes wesentliches Gen konnte der Komplementfaktor 5 als chromosomaler Locus identifiziert werden, welcher signifikant das Fibrorestadium bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beeinflusst [Hillebrandt et al. 2002]. Im Rahmen des Start-up Funds konnte erstmals die Haplotypstruktur des humanen C5-Locus aufgeklärt werden. Haplotypen charakterisieren die Kombinationen gekoppelter Allele auf einem Chromosom. Hierdurch erhöht sich die statistische und biologische Aussagekraft der Analyse, wodurch die Identifizierung von Haplotypen wesentlich zum Erkenntnisgewinn genetischer Analysen beiträgt [Wasmuth et al. 2004]. Nach Identifizierung der häufigsten humanen C5 Haplotypen konnte gezeigt werden, dass zwei dieser Haplotypen signifikant mit dem Fibrorestadium bei chronischer Hepatitis C assoziiert sind. Der Einfluss dieser Haplotypen war zudem unabhängig vom Alter und Geschlecht der untersuchten Patienten, beides bekannte Faktoren mit Einfluss auf die Fibrogenese. Hierdurch konnte die biologische Wertigkeit der gefunden Assoziation weiter unterstrichen werden. Aus der Identifizierung dieses neuen Kandidatengens ergeben sich zudem neuen therapeutische Ansätze zur Hemmung der Fibrogenese. Tierexperimentell konnten wir bereits nachweisen, dass eine Antagonisierung des spezifischen Rezeptors für C5 die Fibrogenese im murinen CCl<sub>4</sub>-Model signifikant inhibiert [Hillebrandt et al. 2002]. Hieraus ergeben sich neue

Perspektiven für humane Studien, zumal eine C5-antagonistische Therapie bereits bei anderen Krankheitsentitäten in Phase II und III Studien eingesetzt wurde. Das Manuskript der dargestellten tierexperimentellen und human Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von C5 bei der Leberfibrose befindet sich aktuell in Revision bei Nature Genetics [Hillebrandt et al. 2004]. Weiterhin konnten Daten dieser Untersuchungen als Vortrag auf der Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Leber 2003 demonstriert werden [Hillebrandt et al. 2003]. Die humanen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Regensburg (Prof. Dr. J. Schölmerich, PD Dr. C. Hellerbrand) innerhalb von HEPNET durchgeführt.

Als weitere Kandidatengene konnten tierexperimentell verschiedene Chemokine und Chemokinrezeptoren identifiziert werden. Chemokine sind eine Familie chemotaktisch wirksamer Zytokine, die eine Rolle in der akuten und chronischen Entzündungsreaktion spielen. Sie stellen daher nach ihrer Identifizierung in der oben beschriebenen QTL-Analyse weitere attraktive Kandidatengene der Fibrogenese dar. Zunächst wurde die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR5 untersucht, der vorwiegend auf Th1-assoziierten Lymphozyten exprimiert wird und so zur Resolution von fibrotischem Gewebe beitragen könnte. In den letzten Jahren konnte zudem eine 32 Basenpaare umfassende Deletion im offenen Leserahmen des CCR5 Gens identifiziert werden, die zu einer verminderten Rezeptorexpression führt und somit eine profibrogene Th2-assoziierte Immunantwort verstärken würde. In Kooperation mit der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Charité Berlin (Prof. Dr. B. Wiedenmann, PD Dr. T. Berg) innerhalb von HEPNET konnte eine der größten bisher durchgeführten Studien zur Bedeutung der CCR5  $\Delta$ 32 Mutation publiziert werden [Wasmuth et al. 2004]. Trotz der geschilderten pathophysiologischen Überlegungen konnte bei über 300 Patienten mit chronischer Hepatitis C eine relevante Assoziation mit dem Fibrosegrad ausgeschlossen werden. Bei einer Subgruppe von Patienten konnte hingegen eine Assoziation der CCR5 Mutation mit dem Entzündungsgrad in der Leberbiopsie nachgewiesen werden. Die Beobachtung ließ sich jedoch nicht in einem zusätzlich untersuchten Kollektiv bestätigen, so dass der Einfluss der CCR5  $\Delta$ 32 Mutation auch auf diesen Phänotyp als gering einzustufen ist. Neben der bereits erfolgten Publikation der Ergebnisse wurde ein Poster, welches die wesentlichen Ergebnisse demonstriert, mit dem Posterpreis der

Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Gastroenterologie 2003 ausgezeichnet.

Ein spezifischer Ligand des Chemokinrezeptors CCR5 ist das Chemokin „regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted“ (RANTES). Innerhalb des Projektes des Start-up Funds konnte für dieses Chemokin erstmals die Haplotypstruktur bei Patienten mit chronischer Hepatitis C aufgeklärt werden. Hierzu wurden alle bekannten Polymorphismen des RANTES Gens mit einer Häufigkeit des Minorallels von über 5% bei 297 Patienten mit chronischer Hepatitis C genotypisiert. Im Anschluss wurden die ermittelten Haplotypen mit dem Fibrorestadium und dem Ansprechen auf eine antivirale Therapie mit Interferon und Ribavirin assoziiert. Die häufigsten Haplotypen waren nicht mit dem Fibrorestadium korreliert, jedoch fand sich eine hochsignifikante Assoziation der Haplotypen mit dem Therapieerfolg. Patienten mit einem durch einen regulatorischen Polymorphismus im ersten Intron definierten Haplotypen hatten ein wesentlich schlechteres Ansprechen auf die antivirale Therapie als Patienten ohne diesen Haplotyp. Dieser Unterschied fand sich besonders auch bei den schlecht zu therapierenden Patienten mit einer Infektion durch den HCV Genotyp 1, was die klinische Bedeutung der Ergebnisse unterstreicht. Diese Daten konnten als Plenarvortrag auf der Jahrestagung der amerikanischen Leergesellschaft (AASLD) 2003 präsentiert werden und sind im August 2004 in *Hepatology* publiziert worden [Wasmuth et al. *Hepatology* 2004]. Auch diese Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Charité Berlin (Prof. Dr. B. Wiedenmann, PD Dr. T. Berg) innerhalb von HEPNET.

Kürzlich konnte weiterhin der Chemokinrezeptor CX3CR1 durch tierexperimentelle Vorarbeiten als möglicher genetischer Locus mit Bedeutung für die Fibrogenese identifiziert werden. Innerhalb des humanen CX3CR1 Gens konnten bisher Polymorphismen beschrieben werden, die zu nicht-konservativem Aminosäureaustausch führen und bereits gezeigte funktionelle Relevanz haben. Diese beiden Polymorphismen (I249V und T280M) konnten nun erstmals bei Patienten mit chronischer Hepatitis C genotypisiert werden. Es zeigte sich ein hochsignifikante Assoziation mit dem Fibrorestadium. Träger des V-Allels hatten signifikant höhere mittlere Fibrorestadien als Personen mit dem homozygoten I-Allel. Dieser Geneffekt war unabhängig vom T280M Genotypen, aber auch vom Alter und

Geschlecht der untersuchten Patienten. Somit konnte ein weiteres Kandidatengen der Fibrogenese bei chronischer Hepatitis C identifiziert werden. Da es durch das V-Allel zu einer negativen Beeinflussung der Rezeptor-Liganden-Interaktion kommt, ist das Auftreten des V-Allels mit einer Verstärkung einer Th2-assoziierten Immunantwort vergesellschaftet. Hierdurch kann auch die pathophysiologische Verbindung der genetischen Daten zur Fibrogenese erklärt werden. Diese Daten sind bisher auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2004 und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen 2004 als Poster demonstriert worden. Das Manuskript der Resultate zur Bedeutung von CX3CR1 befindet sich aktuell in Vorbereitung.

## **2. Verwertungsplan**

Zusammenfassend konnten im Rahmen des Start-up Funds wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der genetischen Suszeptibilität zur Fibrogenese bei chronischer Hepatitis C gewonnen werden. Durch die Identifizierung neuer Zielgene können die beschriebenen Ergebnisse auf längere Sicht zur Entwicklung neuer antifibrotischer Therapiestrategien beitragen. Weiterhin konnte in den vorliegenden Untersuchungen erstmals das Potenzial der Übertragung von tierexperimentell erhobenen Daten in humane Assoziationsstudien nachgewiesen werden. Durch die Identifizierung weiterer, bisher unbekannter Gene in murinen *QTL*-Analysen kann in Zukunft das in den Projekten dieses Start-up Funds nachgewiesene experimentelle Prinzip der genetischen Analyse weiter ausgebaut werden. Die Ergebnisse werden in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert und finden Eingang in die Planung diagnostischer und therapeutischer Studien bei Patienten mit chronischer Hepatitis C im Speziellen und chronischen fibrosierenden Lebererkrankungen im Allgemeinen.

## **3. Projektbezogene Veröffentlichungen 2002-2004**

- Dietrich CG, Geier A, Salein N, **Lammert F**, Roeb E, Oude Elferink RP, Matern S, Gartung C. Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology* 2004;126:1044-1053
- Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, **Lammert F**, Langner C, Zatloukal K, Marschall HU, Denk H, Trauner M.

- Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2004;127:261-274
- Figge A, **Lammert F**, Paigen B, Henkel A, Matern S, Korstanje R, Shneider BL, Chen F, Stoltenberg E, Spatz K, Hoda F, Cohen DE, Green RM. Hepatic overexpression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis. *J Biol Chem* 2004;279:2790-2799
  - Geier A, Reugels M, Weiskirchen R, **Wasmuth HE**, Dietrich CG, Siewert E, Gartung C, Lorenzen J, Bosserhoff AK, Brüggmann M, Matern S, **Lammert F**. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2004;24:285-294
  - Geier A, Siewert E, Dietrich CG, **Lammert F**, Heinrich PC, Matern S, Gartung C. Contribution of interleukin-6 to organic anion transporter regulation during the hepatic acute phase response. *Biochem Biophys Res Comm* 2004;322:232-238
  - Hillebrandt S, Goos C, Matern S, **Lammert F**. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus Hfib1 on chromosome 15. *Gastroenterology* 2002;123:2041-2051
  - Hillebrandt S, **Wasmuth HE**, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Wilkens G, Geier A, Lorenzen J, Gressner AM, Matern S, **Lammert F**. Complement factor 5 is a genetic risk factor that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 2004 (in Revision)
  - **Lammert F**, Hillebrandt S, Matern S. Identification of fibrogenic genes in a polygenic mouse model of liver fibrosis. In: Gressner AM, Heinrich PC, Matern S (Hrsg.). *Cytokines in liver injury and repair*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002, S. 173-176
  - **Lammert F**, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, Matern S, Paigen B, Carey MC. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2 knockout mice: a model for human low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 2004;39:117-128
  - **Lammert F**, Wilkens G, Dietrich CG, Geier A, **Wasmuth HE**, Matern S. Extrahepatische Manifestationen chronischer Lebererkrankungen. *Versicherungsmedizin* 2004; im Druck
  - **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  $\Delta$ 32 polymorphism in two independent cohorts of HCV infected Caucasian patients without hemophilia. *J Mol Med* 2004;82:64-69
- **Wasmuth HE**, Stolte C, Geier A, Dietrich CG, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, **Lammert F**. The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *BMC Infect Dis* 2004;4:1-8
  - **Wasmuth HE**, Matern S, **Lammert F**. From genotypes to haplotypes in hepatobiliary diseases: one plus one equals (sometimes) more than two. *Hepatology* 2004;39:604-607
  - **Wasmuth HE**, Werth A, Müller 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
  - **Wasmuth HE**, Kunz D, Vidacek D, Koch A, Gartung C, Gressner AM, Matern S, **Lammert F**. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immunoparalysis. *J Hepatol* 2005; im Druck
  - **Wasmuth HE**, **Lammert F**, Matern S. Genetische Risikofaktoren der Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen. *Med Klinik* 2003;98:754-762

*Abstracts für Vorträge und Poster*

1. **Wasmuth HE**, Werth A, Mueller T, Berg T, Geier A, Dietrich CG, Gartung C, Matern S, **Lammert F**. Assoziation des Chemokinrezeptors CX3CR1 Polymorphismus V249I mit dem Fibroestadium und der Viruslast bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2004;92:90A
2. Hillebrandt S, **Wasmuth HE**, Keppeler H, Werth A, Geier A, Hellerbrand C, Matern S, **Lammert F**. Der im Mausmodellen als Fibrose-Gen identifizierte Komplement-Faktor 5 (C5) ist mit dem Fibroestadium bei chronischer Hepatitis C assoziiert. *Z Gastroenterol* 2004;42:50A
3. Hillebrandt S, Weiskirchen R, **Wasmuth HE**, Werth A, Keppeler H, Hellerbrand C, Lorenzen J, Gressner AM, Matern S, **Lammert F**. Complement factor 5 (C5) is a genetic determinant of liver fibrogenesis in mice and humans. *Hepatology* 2003;38:222A-223A



4. **Wasmuth HE**, Mueller T, Werth A, Dietrich CG, Geier A, Gartung C, Berg T, Matern S, **Lammert F**. Interacting RANTES/CCL5 gene variants modify the response to combination therapy with interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:245A
5. **Wasmuth HE**, Werth A, Dietrich CG, Geier A, Reugels M, Schirin-Sokhan R, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, **Lammert F**. Bedeutung gekoppelter RANTES Genpolymorphismen für das Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2003;41:798A-799A
6. **Lammert F**, Hillebrandt S, Wasmuth HE, **Matern S**. Progression of hepatic fibrosis: genetic and environmental predisposition. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:A76
7. **Wasmuth HE**, Werth A, Mueller T, Berg T, Dietrich CG, Geier A, Schirin-Sokhan R, Gartung C, Lorenzen J, Matern S, **Lammert F**. CC chemokine receptor (CCR5) Delta 32 polymorphism in two independent cohorts of HCV infected caucasian patients without hemophilia. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:A97-A98