

**Die Kinetik des viralen Core-Antigens und viraler Nukleinsäure unter
kombinierter Therapie der chronischen Hepatitis C mit Peg- α -Interferon
und α -Interferon**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Sebastian Szardien
aus Bad Nauheim**

Gießen 2011

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Institut für Medizinische Virologie
(Leiter: Prof. Dr. med. John Ziebuhr)
(bis zum 31.3.2010: Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich)
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat Wolfram H. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Kracht

Tag des Disputation: 04.07.2012

Meinen Eltern gewidmet

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Hepatitis-C-Virus	1
1.1.1.	Entdeckung	1
1.1.2.	Taxonomie des Hepatitis-C-Virus	2
1.1.3.	HCV-Genotypen	2
1.1.4.	Genomorganisation des HCV	4
1.1.5.	Das Core-Protein	4
1.1.6.	Epidemiologie und Übertragungswege	5
1.2.	Klinischer Verlauf einer HCV-Infektion	7
1.3.	Diagnostik	10
1.4.	Therapie	11
1.5.	Prognose	17
1.6.	Das TT-Virus	20
1.7.	α -GST	21
1.8.	Fragestellung dieser Arbeit	21
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material	23
2.2.	Methoden	26
3.	Studiendesign	33
4.	Ergebnisse	35
4.1.	HCV-RNA-Frühkinetik	35
4.1.1.	Initial responder	37
4.1.2.	Delayed responder	43
4.1.3.	Non responder	55
4.1.4.	Reaktionstypen der HCV-RNA-Frühkinetik mit und ohne Roferon	59
4.2.	HCV-Core-Antigen	61
4.3.	Ferritin-Bestimmung vor Therapiebeginn	68
4.4.	α -Glutathion-S-Transferase im Bezug zur viralen Kinetik	69

4.5.	TTV-Viruslast und TTV-Frühkinetik	79
5.	Diskussion	89
5.1.	Pegyliertes Interferon plus Interferon- α : Therapie der Zukunft?	89
5.2.	HCV-Core-Antigen: Diagnostische Alternative zur HCV-PCR?	91
5.3.	HCV-RNA und α -GST als Marker der spezifischen IFN-Response	94
5.4.	TTV: Bedeutung der Koinfektion und Therapie-Response	96
6.	Zusammenfassung	99
7.	Anhang	102
7.1.	Literaturverzeichnis	102
7.2.	Abkürzungsverzeichnis	116
7.3.	Publikationsverzeichnis	119
7.4.	Erklärung	121
7.5.	Danksagung	122
7.6.	Tabellarischer Lebenslauf	123

1. Einleitung

1.1. Das Hepatitis- C- Virus

1.1.1. Entdeckung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde erstmals 1989 als Erreger der damals so genannten parenteral übertragenen Non-A-/Non-B-Hepatitis(NANBH) mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert. Zu diesem Zeitpunkt waren nur die Hepatitis-Viren A, B und D als Auslöser einer Hepatitis bekannt, welche seit den 70er Jahren mit serologischen Tests nachgewiesen werden konnten. Da aber trotz gründlicher Untersuchung der Blutspender auf Hepatitis-B-Virus nach wie vor viele Fälle von Posttransfusionshepatitiden auftraten, bezeichnete man jene Fälle, in denen eine durch Transfusion übertragene Hepatitis B oder A ausgeschlossen werden konnte als Non-A-/Non-B-Hepatitis. Ende der 70er Jahre gelang es dann erstmals den Arbeitsgruppen um H. ALTER sowie E. TABOR, Schimpansen mit dem Erreger der Non-A-/Non-B-Hepatitis zu infizieren und die Übertragbarkeit der Krankheit eindeutig zu beweisen.

Allerdings war es zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich, den Erreger zu identifizieren, da er, im Gegensatz zum HAV und HBV, weder elektronenmikroskopisch noch mittels serologischen Verfahren nachweisbar war.

Das entscheidende Experiment zur molekularen Charakterisierung gelang dann 1989 (CHOO GL et al.) als man in einem aufwendigen Verfahren aus dem Plasma eines NANBH-infizierten Schimpansen mittels randomisierter Klonierung von cDNA-Fragmenten eine Lambda-Phagen-DNA-Expressionsbibliothek gewinnen konnte. Anschließend konnte man dann Seren von Patienten, bei denen eine NANBH bestand, auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen die exprimierten hypothetischen Polypeptidfragmente viralen Ursprungs untersuchen. Schließlich gelang es, anhand einer kurzen HCV-spezifischen Sequenz nach und nach das HCV-Genom zu klonieren und einen ersten serologischen Test für das HCV zu etablieren (CHOO et al., 1989).

Mittels serologischer Verfahren gelang es weiterhin auch nachzuweisen, dass der weitaus größte Teil der posttransfusionellen Hepatitiden auf eine Infektion mit dem HCV zurückzuführen ist. Dank entsprechender Fortschritte in der Diagnostik und Testung aller Blutspender auf Antikörper gegen HCV (Anti-HCV) und HCV RNA, ist es heute möglich, eine Infektion über Blutkonserven nahezu vollständig auszuschließen. Das Restrisiko hierfür wird in Deutschland mit 1:10.000.000 angegeben (NÜBLING CM ET AL., 2008).

1.1.2. Taxonomie des HCV

Das HCV wurde als eigene Gattung *Hepacivirus* in die Familie der Flaviviridae eingegliedert (VAN REGENMORTEL, MHV et al., 2000). Weitere Gattungen dieser Familie sind *Flavivirus* und die *Pestivirus*. Alle Vertreter dieser Familie sind behüllt und besitzen als Genom eine einsträngige RNA positiver Polarität. Die Erreger der Gattung Flavivirus rufen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren eine große Anzahl von fieberhaften Virusinfektionen hervor. Hierzu zählen das Gelbfieber, das Dengue-Fieber, die Frühsommer-Meningoenzephalitis, das West-Nil-Fieber und die japanische B-Enzephalitis. Ihnen gemeinsam ist die Übertragung durch einen Arthropoden-Vektor. Die Viren der Gattung Pestivirus spielen vor allem bei Tieren als Krankheitserreger eine Rolle. Hierzu zählen unter anderem das Virus der klassischen Schweinepest, das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und das Virus der Border Disease der Schafe.

1.1.3. HCV-Genotypen

Seit Einführung molekularbiologischer Methoden hat die Anzahl vollständig sequenzierter HCV-Genome ständig zugenommen. Vergleicht man die Genome so zeigen sich teils erhebliche Sequenzunterschiede von mehr als 30 %. Daher war es sinnvoll, die HCV-Isolate in Genotypen und Genosubtypen zu unterteilen. Zwischen HCV-Genotypen beträgt die Homologie der Aminosäure-Sequenzen weniger als 72 %. Bei einer Übereinstimmung von 72-86 % werden die Isolate dem gleichen Genotyp, jedoch unterschiedlichen Subtypen zugeordnet. Erst Isolate mit einer Sequenzhomologie größer als 86 % zählen zum gleichen Subtyp (SIMMONDS et al. 1994). Die Genotypen werden in der Reihenfolge ihrer

Entdeckung mit Ziffern, die Subtypen mit kleinen Buchstaben benannt.

Allerdings ist bei dieser Einteilung zu beachten, daß das HCV keineswegs nur in einheitlicher Form im infizierten Patienten vorliegt, sondern vielmehr, wie es typisch für viele RNA-Viren ist, in einer großen Vielfalt von Varianten zirkuliert (Quasispezies), bedingt durch die hohe Mutationsrate, die mit 10^4 bis 10^5 pro Nukleotidposition und Replikationszyklus angegeben wird (HOLLAND JJ et al., 1992).

Bei der Vielfalt der Genotypen ist zu berücksichtigen, daß die einzelnen Geno- und Subtypen ein regionales Verteilungsmuster aufweisen und manche Genotypen fast ausschließlich auf bestimmte geographische Regionen begrenzt sind. In Europa, Nord- und Südamerika sind die Genotypen 1a und 1b die häufigsten, gefolgt von den Genotypen 2 und 3, wobei vor allem der Genotyp 3a eine hohe Prävalenz bei i.v. Drogenabhängigen hat. Die Genotypen 4-6 findet man in Deutschland eher selten, hierbei dürfte es sich vor allem um importierte Stämme aus Afrika und Asien handeln. In Deutschland ist der Subtyp 1b mit 44 % vorherrschend, gefolgt vom Subtyp 1a mit 36 % (ROSS RS et al., 2000).

Neben der großen Bedeutung der Genotypisierung für die HCV-Forschung, findet diese auch in der klinischen Praxis zahlreiche Anwendungen. Zum einen ist es möglich, anhand der Virussequenz Rückschlüsse auf den Übertragungsmodus und sogar den Infektionsweg zu ziehen. Zum anderen wurde postuliert, die Schwere des Krankheitsverlaufs sei vom Genotyp abhängig (MONDELLI MU et al., 1999). Ob diese Korrelation jedoch tatsächlich existiert, ist fragwürdig, da die Verteilung der Genotypen in den einzelnen Altersgruppen variiert. So findet man beispielsweise den Genotyp 1b, dem eine besonders starke Leberschädigung und das häufigere Auftreten von Zirrhose zugeschrieben wurde (NAGAYAMA K et al., 2000), vor allem bei älteren Patienten nach Bluttransfusionen. Insofern lässt es sich nicht klar zuordnen, ob die Schwere des Krankheitsverlaufs vom Genotyp oder eher von der Viruslast und von Alter und Allgemeinzustand des Patienten abhängig ist.

Viel aussagekräftiger als für den Krankheitsverlauf ist der Genotyp für die Prognose einer geplanten Interferon-Therapie. Hier konnte in vielen Studien gezeigt werden, daß die Genotypen 2 und 3 durchweg bessere Ansprechraten auf eine Interferon-Therapie zeigten als andere Genotypen, insbesondere als Genotyp 1b, der als besonders therapieresistent gilt (ZEUZEM S ET AL., 2009; BOYER N et al., 2000).

1.1.4. *Genomorganisation des HCV*

Das HCV enthält ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität von ca. 9600 Nukleotiden. Das Genom beginnt am 5'-Ende mit einer für alle Isolate in weiten Abschnitten konservierten nicht-codierenden Region (NCR) von 341 Nukleotiden (HAN JH et al., 1991), die eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) enthält und die Translation des HCV-Polyproteins von dem als mRNA dienenden RNA-Strang steuert. Der 5'-NCR folgt ein langer offener Leserahmen von ca. 9000 Nukleotiden, der für ein, je nach Virustyp, 3010-3033 Aminosäuren-langes Vorläufer-Polyprotein kodiert. Von diesem Polyprotein werden an bestimmten Schnittstellen einzelne Proteine co- oder posttranslational von wirtseigenen oder viruskodierten Proteasen abgespalten. Dabei entstehen aminoterminal die Strukturproteine Core, E1 und E2 und carboxyterminal die Nichtstrukturproteine p7, NS2-NS5B (SHARMA SD, 2010; GIANNINI C, 2003; REED KE et al., 2000).

1.1.5. *Das Core-Protein*

Am aminoterminalen Ende des HCV-Polyproteins liegt das Core-Protein mit einer Größe von 21 kDa. Mittlerweile ist es möglich, mit Hilfe von hochempfindlichen Enzym-Immunoassays dieses Core-Protein bei virämischen Patienten im Serum nachzuweisen (AOYAGI ET al., 1999). Bisher wurden Core-Antigen-Assays vor allem zu Forschungszwecken verwendet, klinische Bedeutung könnten sie in Zukunft erlangen, da das Core-Antigen im Gegensatz zu den HCV-Antikörpern schon früher im Verlauf einer Infektion nachweisbar ist und somit das diagnostische Fenster verkleinert wird.

Die genaue Regulation der Core-Prozessierung und die Funktion der dabei entstehenden Produkte sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch kennt man für das reife, zytoplasmatische Core eine Reihe von Funktionen: Es kann an RNA binden (SHIMOIKE T et al., 1999), es bildet Oligomere (MATSUMOTO M et al., 1996) und bindet an zytoplasmatische Lipidtröpfchen, was für die Virusmontage benötigt wird (MIYANARI Y et al., 2007).

Weiterhin schreibt man dem Core-Protein die Fähigkeit zur Aktivierung zellulärer und viraler Promotoren zu. Dies könnte eine Rolle in der Pathogenese einer HCV-Infektion und der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms spielen. So wurde beispielsweise in einem Experiment mit transgenen Mäusen gezeigt, dass durch Core ein hepatozelluläres Karzinom *in vivo* induziert werden kann (MORIYA K et al., 1998).

Ein anderes pathogenes Potential des Core-Proteins scheint in seiner Hemmung der fas-, c-myc- und TNF α -induzierten Apoptose zu liegen (MARUSAWA H et al., 1999). Auf diesem Weg könnte Core zur Persistenz des Virus im Organismus beitragen.

1.1.6. Epidemiologie und Übertragungswege

Die chronische Hepatitis C ist weltweit verbreitet. Nach Schätzungen der WHO sind ungefähr 3% der gesamten Weltbevölkerung (also ca. 170 Millionen Menschen) mit HCV infiziert. Nach Daten des Robert-Koch-Instituts gibt es in Deutschland ca. 400.000-500.000 Virusträger, dies entspricht einer Prävalenz von 0,4-0,7%. Die Inzidenz neu diagnostizierter und an das RKI gemeldeter Infektionen lag im Jahr 2009 bei 7,5 Fällen pro 100.000 Einwohner und ist somit ca. 7 mal höher als bei Hepatitis-A oder -B (Infektionsepidemiologisches Jahrbuch, Robert-Koch-Institut, 2009). Ähnliche Prävalenzen und Inzidenzen findet man in anderen westlichen Industrienationen (0,5-1,5 %). Da aber bei der chronischen Hepatitis C beschwerdelose Verläufe und persistierend normale Transaminasen häufig vorkommen, existiert vermutlich eine hohe Dunkelziffer.

Die Prävalenz der Hepatitis C ist in bestimmten Risikogruppen signifikant höher, zum Beispiel bei i.v. Drogenabhängigen (HWANG LY ET AL., 2000).

Die Übertragung des Hepatitis-C-Virus erfolgt in der Regel parenteral über Blut, Blutprodukte oder durch „needle-sharing“, bzw. heute häufiger durch das „Löffel teilen“ bei drogenabhängigen Patienten.

Vor Einführung des Blutspenderscreenings auf Anti-HCV 1990 war die Gabe von Blut und Blutprodukten einer der häufigsten Übertragungswege des Hepatitis-C-Virus. Das Risiko, auch heute noch durch Blutprodukte mit HCV infiziert zu werden, wird seit vielen Jahren auf nahezu Null geschätzt (REGAN FA et al., 2000), insbesondere in Deutschland und

anderen Ländern, wo seit langem zusätzlich auf HCV-RNA untersucht wird (NÜBLING CM ET AL., 2009)

In den entwickelten Ländern ist daher das Hauptrisiko für die Übertragung von HCV der intravenöse Drogenkonsum. Die gängige Praxis des „needle sharing“ und des „Löffelteilens“ bei i.v. Drogenabhängigen führte zu einer etwa 70%igen Durchseuchung (WOODFIELD DG, 1993). Auch Prozeduren wie Tätowierungen oder Piercings können bei fehlender Einhaltung hygienischer Standards zur Übertragung des Virus führen. Bei Verwendung von mehrfach benutzten Nadeln können auch die Akupunktur sowie andere medizinische Eingriffe zur Infektion führen. Letzteres ist vor allem in den Entwicklungsländern für einen großen Teil von Neuinfektionen verantwortlich, da dort aus Kostengründen Einweginjektionsmaterialien mehrfach verwendet werden (KANE et al., 1999).

Die Übertragung von HCV von einer Mutter auf ihr Kind ist relativ selten und erfolgt meist perinatal durch direkten Kontakt des Neugeborenen mit infektiösem Blut der Mutter. HCV-RNA konnte sowohl im Wochenbett-Ausfluß als auch im Menstruationsblut nachgewiesen werden (KURAUCHI O et al., 1993). Das Risiko einer perinatalen Infektion ist mit 5% geringer als bei HBV oder HIV, jedoch gibt es im Gegensatz zu diesen Viren bei HCV keine gezielte Prophylaxe gegen die Übertragung.. Das Risiko einer vertikalen Transmission scheint mit der Höhe der HCV-RNA-Konzentration im mütterlichen Blut zu korrelieren und ist umso größer, je höher die Viruslast der Mutter ist (ROBERTS EA, 2002, DI DOMENICO C ET AL., 2006).

Im Gegensatz zur Infektion mit HIV und HBV ist das Risiko einer sexuellen Übertragung bei HCV ausgesprochen gering. Mehrere Autoren konnten zeigen, daß sowohl bei heterosexuellen wie auch bei homosexuellen Partnern von HCV-Infizierten die Durchseuchungsrate niedrig ist. Da sich bei den infizierten Partnern häufig unterschiedliche Genotypen wie beim Partner zeigten, lässt dies auf andere Infektionsquellen schließen. Zudem konnte bisher in der Samenflüssigkeit, im Vaginalsekret und im Speichel keine HCV-RNA nachgewiesen werden (DEBONO E et al., 2000; FRIED MW et al., 1992).

Das Risiko sich im medizinischen Bereich durch eine Nadelstichverletzung mit einer infizierten Kanüle etc. zu infizieren ist abhängig von der Menge des durch die Verletzung

übertragenen Bluts und von der Viruslast des Patienten. Durch Schleimhaut- oder Hautkontakt mit infiziertem Blut ohne gleichzeitige Hautverletzung ist bisher keine Infektion dokumentiert worden.

1.2.Klinischer Verlauf einer HCV-Infektion

Die akute Hepatitis C wird in diesem Stadium selten diagnostiziert, weil sie oftmals beschwerdefrei verläuft. Nur bei etwa 20-30% der Patienten mit akuter Hepatitis C tritt ein Ikterus auf. In der Mehrzahl der Fälle verläuft die akute Hepatitis C jedoch anikterisch mit uncharakteristischen Beschwerden wie Müdigkeit, Fieber, Übelkeit, reduzierter Leistungsfähigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen, teilweise auch völlig asymptomatisch. Fulminante Verläufe sind hingegen außerordentlich selten. Aus Untersuchungen an Patienten mit bekanntem Infektionszeitpunkt weiß man, daß die Inkubationszeit 2- 26 Wochen, vorwiegend 6- 12 Wochen beträgt (ALBERTI A et al., 2002).

Das Hauptproblem der HCV-Infektion liegt in ihrer hohen Chronifizierungsrate. In der Pathogenese der chronischen Hepatitis C spielen Immunmechanismen und die Quasispezies-Natur des HCV eine entscheidende Rolle: Durch die Ungenauigkeit der viralen Polymerase kommt es bei der Replikation zum Einbau nichtkomplementärer Nukleotide und somit zur Bildung einer komplexen Genompopulation, welche man als „Quasispezies“ bezeichnet (MARTELL M et al., 1992). Diese Eigenschaft teilt das HCV im Prinzip mit den meisten RNA-Viren sowie mit Viren, die über reverse Transkription replizieren (z.B. HIV und HBV). Viele RNA- oder Retroviren sind jedoch so an ihren Wirt adaptiert, dass die allermeisten Mutanten nicht konkurrenzfähig sind, während HCV eine besondere Flexibilität aufweist. Diese extrem hohe genetische Variabilität von HCV führt letztendlich dazu, daß der Organismus zwar eine neutralisierende Immunantwort gegen eine Hauptvariante aufbauen kann, jedoch andere Virusvarianten der Immunantwort entgehen können, wiederum replizieren und schließlich dominant werden. Dies erklärt auch, daß trotz nachweisbarer neutralisierender Antikörper die allermeisten Patienten nicht in der Lage sind, das Virus im chronischen Stadium einer HCV-Infektion zu eradizieren und das Blut auch infektiös ist..

Bisher ist es nicht möglich, im Einzelfall vorherzusagen, ob und weshalb eine akute Infektion in ein chronisches Stadium übergeht. Hierzu erscheint es sinnvoll, die Entwicklung von Quasispezies-Populationen im akuten Stadium der Infektion zu beobachten. Eine selbstlimitierende Infektion weist im Gegensatz zu einer chronifizierenden Infektion eine geringere genetische Variabilität auf (FARCI P et al., 2000). Die Variabilität wird durch die Immunreaktion vorangetrieben. Die Immunreaktion kann allerdings im Falle der Chronifizierung die Virusvermehrung nicht wirksam hemmen. Insbesondere ein Mangel an aktiven zytotoxischen T-Zellen spielt hier eine Rolle (PUJOL FH ET AL., 2005). Dagegen findet man bei Patienten mit einer ikterisch verlaufenden akuten Hepatitis C und entsprechend starker zytotoxischer Immunreaktion eine niedrige Chronifizierungsrate im Vergleich zu Patienten mit einer asymptomatischen akuten Hepatitis C (Hoofnagle JH, 2002).

Die Analyse der Immunantwort zeigt in der Tat Unterschiede zwischen akut und chronisch Erkrankten. So belegen neuere Studien einen Zusammenhang zwischen der CD4-T-Zellantwort (ULSENHEIMER A et al., 2003) und der CD8-T-Zellantwort (WEDEMEYER H et al., 2002).

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C kann das Beschwerdebild vielgestaltig sein. Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Zirrhose klagen häufig über unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Muskel- und Gelenkschmerzen, Gewichtsverlust und Oberbauchbeschwerden. Hinzu kommen psychische und neurologische Beeinträchtigungen mit Depressionen, Konzentrationsschwäche und Gedächtnisstörungen. Bei einigen Patienten kommt es zu extrahepatischen immunologischen Manifestationen wie einer gemischten, essentiellen Kryoglobulinämie, einer membranproliferativen Glomerulonephritis, Lichen ruber planus und Rheumafaktor-negativer Arthritis. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können dann weitere Symptome hinzukommen, die vor allem vom Grad der Leberschädigung abhängen. Vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Vollbild der Leberzirrhose vergehen in der Regel 20 bis 30 Jahre, wobei dieser Prozess durch die Lebensgewohnheiten des Patienten, insbesondere durch Alkoholkonsum und hepatotoxische Medikamente oder Chemikalien, erheblich beschleunigt werden kann (MONTO A UND WRIGHT TL, 2001).

Zur Beurteilung der hepatozellulären Schädigung vor Therapiebeginn ist die Leberbiopsie

geeignet. Hierbei unterscheidet man, um den Schweregrad und Verlauf der Hepatitis C zu charakterisieren, das „Grading“ und das „Staging“ . Im Grading wird das Ausmaß der nekroinflammatorischen Veränderung beurteilt, im Staging dagegen die Ausdehnung der Fibrose und der strukturelle Umbau des Leberparenchyms.

Zur Beurteilung von entzündlicher Aktivität und Fibrosestadium der chronischen Hepatitiden wurden mehrere semiquantitative Scoresysteme entwickelt, deren Ziel eine objektivierbare und reproduzierbare Beurteilung von Leberbiopsien ist.

Die überwiegende Zahl der Patienten mit mehrjähriger HCV-Infektion haben kaum Chancen einer Spontanheilung bzw. spontanen HCV-Elimination. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, daß die Prognose ungünstig sein muss. Langzeitbeobachtungen zum Spontanverlauf der chronischen Hepatitis C haben gezeigt, daß bei ca. 30 % der Patienten mit der Entwicklung einer Zirrhose zu rechnen ist (YANO M et al., 1996; MARCELLIN P, 1999). Daraus wiederum kann man schließen, daß ein großer Teil der HCV-infizierten Patienten keine gravierenden Lebererkrankungen entwickeln wird. Dennoch ist im Hinblick auf die relativ hohe Prävalenz der chronischen HCV-Infektion die Zahl der Patienten mit progredienter chronischer Hepatitis und schließlich Entwicklung einer Zirrhose erheblich. Hinzu kommt das hohe Risiko hinsichtlich der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Das hepatozelluläre Karzinom entsteht bei der chronischen Hepatitis C fast ausschließlich auf dem Boden einer Leberzirrhose mit einer Inzidenz von 2-5 % pro Jahr (EL-SERAG HB, 2002). Eine Leberzirrhose bzw. ein HCC infolge einer chronischen Hepatitis C unterscheiden sich klinisch und prognostisch nicht von Zirrhosen oder Lebertumoren anderer Genese.

Auffallend häufig ist die Hepatitis C mit Autoimmunphänomenen assoziiert. Zu diesen zählen die gemischte, essentielle Kryoglobulinämie, die membranoproliferative Glomerulonephritis, der Lichen ruber planus, die seronegative Arthritis, die Keratokonjunktivitis sicca und eine thyreoidale Autoimmunität. Bei den Kryoglobulinen handelt es sich um Immunkomplexe, die bei Kälte präzipitieren. Sie lassen sich bei etwa der Hälfte der Patienten mit chronischer Hepatitis C nachweisen und werden mit den Symptomen Müdigkeit, Hautrötung, Neuropathien und der membranoproliferativen Glomerulonephritis in Verbindung gebracht (MANNES MP, 1999).

1.3.Diagnostik

Eine HCV-Diagnostik sollte bei früheren oder bestehenden Expositionsrisiken (Bluttransfusionen vor 1991, i.v. Drogenabusus) zur Abklärung erhöhter Transaminasen oder zur Abklärung einer bisher unklaren chronischen Lebererkrankung durchgeführt werden. Die Diagnose erfolgt anhand serologischer und molekularbiologischer Parameter.

a) Serologische Diagnostik

Der klassische Immunoassay (IA) ist aufgrund niedrigerer Kosten und der einfacheren Handhabung der Suchtest erster Wahl. Die IAs der 3. Generation, welche man heute zur Primärdiagnostik verwendet, weisen neben Antikörpern gegen Nichtstrukturproteine der NS3- und NS4-Region und Antikörpern gegen Teilpeptide des Core-Proteins zusätzlich Antikörper gegen rekombinante Proteine der NS5-Region nach. Außerdem wurde bei ihnen die Sensitivität gegenüber früheren Testverfahren durch eine höhere Reaktivität des NS3-Antigens verbessert (COUROUCE AM et al., 1994; VERNELEN K et al., 1994). Trotz stetig verbesserter Spezifität weisen auch die neueren Testverfahren immer noch das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen auf. Aus diesem Grund sollte bei positivem Testbefund ein Bestätigungstest erfolgen.

Früher verwendete man verschiedene Immunoblot-Techniken, welche jedoch aufgrund mangelnder Sensitivität nur noch selten durchgeführt werden. Somit wird heutzutage zur Bestätigung eines positiven Anti-HCV-Tests bei klinisch begründetem Verdacht auf eine Lebererkrankung die PCR auf HCV-RNA zur Bestätigung eingesetzt.

Wie bereits oben erwähnt, dauert es eine gewisse Zeit, bis nach der Infektion mit HCV Antikörper nachweisbar werden, da das Immunsystem einige Wochen benötigt, um nach dem Kontakt mit dem Virus messbare Antikörperspiegel zu bilden. Daraus ergibt sich ein diagnostisches Fenster, in dem das Virus aktiv ist, Antikörper aber noch nicht nachgewiesen werden können. Deshalb ist frühestens 4 Wochen nach Infektion mit einem positiven Testergebnis zu rechnen, das Maximum des Antikörpertiters wird bei einer chronisch verlaufenden Infektion nach ein bis zwei Jahren erreicht (NETSKI, DM et al. 2005).

b) Molekulare Diagnostik

Zur Detektion von HCV-RNA stehen heute eine Vielzahl verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Verfügung. Zum qualitativen Nachweis von HCV-RNA hat sich die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgesetzt. Nach einer HCV-Infektion kann HCV-spezifische RNA bereits nach einer Woche mittels RT-PCR nachgewiesen werden (FARCI P et al., 1991).

Für die Routine-Diagnostik stehen heute standardisierte quantitative Testkits zur Verfügung (TaqMan HCV[®], Roche Molecular Systems, Real time HCV, Abbott) (MATSUWARA, K et al. 2008). Mit Hilfe dieser Verfahren lässt sich HCV-RNA bis zu einer unteren Grenze von ca. 40 IU/ml nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit, deren experimenteller Teil im Juli 2004 begonnen wurde, wurde zur Quantifizierung eine Labor-eigene Version der real-time-RT-PCR im Lightcycler-System verwendet, deren Funktionsweise im Methodikteil ausführlich erläutert ist. Gegenüber den damals häufig verwendeten Quantifizierungsmethoden weist die Lightcycler-Methode einige Vorteile auf: Zum einen ist die Spezifität durch die Verwendung von Hybridisierungs sonden sehr hoch, zum anderen konnte man durch das One-tube-System die Kontaminationsgefahr erheblich reduzieren. Bei einer Intra-Test-Genauigkeit von <0,01 und einer Inter-Test-Präzision <0,05 log liegt der lineare Messbereich zwischen 200 bis > 10⁸ IU/ml, wobei die qualitative Sensitivität bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 80 IU/ml reicht (SCHUETTLER CG et al., 2003)

1.4. Therapie

In der Therapie der chronischen Hepatitis C sind innerhalb der letzten 20 Jahre erhebliche Fortschritte erreicht worden. Während Anfang der 90er Jahre nur ein geringer Prozentsatz (10-15%) der Patienten dauerhaft von der Therapie profitierte, können heute anhaltende Remissionsraten von ca. 50% erreicht werden. Zu diesen Fortschritten hat die Einführung der Kombinationstherapie aus Interferon-alpha plus Ribavirin und die Entwicklung der pegylierten Interferone wesentlich beigetragen.

Die Wirksamkeit von Interferon gegen NonA, nonB Hepatitis wurde schon 1986, also noch

vor der Identifizierung des HCV, gezeigt (HOOFNAGLE JH et al., 1986). Das breite Wirkungsspektrum des Nukleosidanalogons Ribavirin ist sogar schon seit Anfang der siebziger Jahre bekannt (SIDWELL RW et al., 1972). Zunächst wurde Ribavirin nur als Monotherapie mit geringem Erfolg getestet, erste Studien zur Kombinationstherapie von Ribavirin und Interferon wurden dann 1994 durchgeführt (BRILLANTI S et al., 1994). Der kombinierte Einsatz beider Medikamente wurde dann 1999 von der European Association for the Study of the Liver als Standardtherapie bei chronischer Hepatitis C empfohlen (EASL, 1999).

Interferone sind körpereigene Proteine und zählen zu den Zytokinen. Sie werden von Leukozyten und Fibroblasten gebildet und sind in der Lage, bei einer Virusinfektion eine Immunreaktion des Körpers mit Einleitung spezifischer Abwehrmechanismen auszulösen. Die Interferone weisen dabei antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften auf. Im Zusammenhang mit der Behandlung der chronischen Virushepatitis interessieren insbesondere die antivirale und die immunmodulatorische Wirkung. Die antiproliferative Wirkung ist für einige Nebenwirkungen verantwortlich, die man bei Patienten unter länger dauernder Interferon-Therapie beobachtet, wie z. B. Thrombozytopenie und Leukopenie sowie Haarausfall.

Die Wirkungen treten innerhalb kürzester Zeit auf und werden über eine zelluläre Signaltransduktionskaskade nach Bindung an spezifische Interferonrezeptoren vermittelt. Anhand ihrer Struktur unterteilt man die Interferone in Alpha-, Beta- und Gamma-Interferone. Hierbei unterscheidet man die Typ-I-Interferone (α - und β -Interferone), die vor allem antivirale Eigenschaften aufweisen und Typ-II-Interferone (γ -Interferon), welche in erster Linie immunmodulatorisch wirken. Das bei der Therapie der Hepatitis C hauptsächlich zum Einsatz kommende Interferon- α , von dem 15 verschiedene Subtypen existieren, wird im Wesentlichen von Leukozyten, aber auch von Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten produziert.

Die Interferon-Wirkungen werden, wie bereits oben erwähnt, durch Rezeptoren vermittelt. In der Zelle kommt es über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden (Jak-Stat-Signaltransduktionsweg) zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (SARASIN-FILIPOWICZ M, ET AL., 2008) und zur Expression antiviraler Effektorproteine, zu welchen die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase

(2',5'-OAS) sowie das Mx-Protein zählen (STARK GR et al., 1998).

Die Induktion der 2', 5'-OAS führt zur Bildung von 2', 5'-Oligoadenylat, das wiederum eine Ribonuklease aktiviert, die die Virusreplikation hemmt. Die Aktivierung der PKR bewirkt eine Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF2 α , wodurch es zu einer Blockierung der Proteinbiosynthese und somit auch der Virusreplikation kommt.

Die immunmodulatorische Wirkung der Alpha-Interferone wird hauptsächlich über eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen vermittelt, die wiederum selektiv die virusinfizierten Zellen abtöten. Außerdem induzieren Alpha-Interferone in den meisten Zellen des Körpers die Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen und erhöhen so deren Resistenz gegen natürliche Killerzellen und ihre Anfälligkeit für zytotoxische CD8-T-Zellen (TILG H., 1997).

In Deutschland sind verschiedene gentechnisch hergestellte α -Interferone zur Therapie der Hepatitis C zugelassen: Interferon- α 2a (Roferon®-A, Hoffmann-LaRoche), Interferon- α 2b (Intron A®, Essex Pharma) sowie die jeweils pegylierten Formen und das Konsensusinterferon- α , welches in seiner Sequenz jeweils die häufigste Aminosäure von allen Interferon- α -Subtypen aufweist. Dieses Consensus-Interferon ist in Deutschland als Inferax® (Yamanouchi) zur HCV-Therapie zugelassen. Einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie der chronischen Hepatitis C stellte die Entwicklung der pegylierten Interferone (PEG-IFN- α) dar. Polyethylenglykole (PEG) sind nicht toxische, biologisch inerte Polymere, die an Proteine konjugiert deren Halbwertszeit im Serum verlängern. Zwei verschiedene pegylierte Formen von Interferon- α sind entwickelt worden. Interferon- α 2a wurde mit einem 40kDa verzweigt-kettigen Methoxy-PEG-Molekül kovalent gebunden, Interferon- α 2b mit einem 12 kDa linear aufgebauten PEG-Molekül konjugiert. Die Eliminationshalbwertszeit des Standard-Interferons wird dabei von 8 Stunden auf 60-80 Stunden (PEG-IFN- α 2a) bzw. 30-40 Stunden (PEG-IFN- α 2b) verlängert. Pegylierte Interferone werden nur einmal pro Woche subkutan appliziert und erzielen deutlich gleichmäßigere Wirkspiegel als die Applikation von nicht-modifizierten Standard-Interferonen (HEATHCOTE EJ et al., 2000; ZEUZEM S, et al., 2000).

Alpha-Interferone können verschiedene direkte und indirekte antivirale Mechanismen wie intrazelluläre virale RNA-Degradation, Hemmung der viralen RNA-Translation,

Aktivierung des zellulären Immunsystems zur Erkennung virusbefallener Zellen und Prävention einer Virusinfektion von suszeptiblen Zellen induzieren. Welcher Effekt bei der IFN- α -Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vordergrund steht, ist nicht genau bekannt. Neue Erkenntnisse über die mögliche IFN- α -Wirkung bei chronischer Hepatitis C wurden durch mathematische Berechnungen der Hepatitis C Viruskinetik unter IFN- α -Therapie abgeleitet.

Nach IFN- α -Applikation kommt es mit einer Latenz von ca. 8 h bei den meisten Patienten zu einem raschen Abfall der Hepatitis C Virämie (Phase 1). Die erste Phase erklärt man sich durch eine direkte Hemmung des Replikationszyklus des HCV durch Interferon (SARASIN-FILIPOWICZ M, et al., 2008; NEUMANN AU et al., 1998)). Nach 24-48 Stunden verläuft dann der Abfall der HCV-RNA wesentlich flacher. Vermutlich spielen hier die immunmodulatorischen Effekte des Interferons die entscheidende Rolle. Bestätigt wird diese These durch die Tatsache, daß es nach initial erfolgreicher IFN- α -Therapie, bei vielen Patienten zu einem Relapse kommt. Bei Patienten mit anhaltender Remission nach IFN- α -Therapie konnte hingegen gezeigt werden, daß es zu einer anhaltenden und starken T-Zell-Antwort gegen HCV-Proteine kam. Somit scheint im Wesentlichen die immunologische Kontrolle der HCV-Infektion für ein dauerhaftes Ansprechen auf die IFN- α -Therapie verantwortlich zu sein.

Neuere Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen der Expression der MicroRNA 122 (miR-122) und dem therapeutischen Ansprechen auf α -IFN zeigen (JOPLING CL et al., 2008; PEDERSEN IM et al., 2007). Bei Patienten, die nicht auf eine Therapie mit pegyliertem Interferon ansprechen, konnten hierbei deutliche niedrigere miR-122-Spiegel in Lebergewebe nachgewiesen werden als bei Patienten, die adäquat auf die Interferon-Therapie ansprechen. Die exakte pathogenetische Rolle der miR-122 ist derzeit noch nicht geklärt, es wurde jedoch postuliert, dass die miR-122-Expression durch die Gabe von Interferon negativ reguliert wird und daher Patienten, mit initial niedrigen miR-122-Spiegeln bereits vor Therapiebeginn ein aktiviertes Interferon-System in der Leber haben und es somit nach IFN-Applikation nicht zu einer signifikanten Aktivierung von IFN-Zielgenen kommt (SARASIN-FILIPOWICZ M et al., 2008).

Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid) zählt zu den Nukleosidanaloga, wird von eukaryontischen Zellen rasch aufgenommen und weist nach intrazellulärer

Phosphorylierung eine virostatistische Aktivität gegen eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren auf. Als Monotherapie ist Ribavirin gegen das HCV unwirksam. Als Wirkmechanismen in der Kombinationstherapie bei der chronischen Hepatitis C werden immunmodulatorische Effekte, wie die Verstärkung einer Th1-abhängigen Immunantwort, eine Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase mit Verminderung des intrazellulären GTP-Pools, eine Hemmung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des HCV (PATTERSON JL et al., 1990) und die Induktion einer erhöhten Mutationsfrequenz (HOFMANN WP et al., 2007) diskutiert.

1994 konnte erstmals gezeigt werden, daß sich eine Kombination von IFN- α und Ribavirin günstig auf das Therapieansprechen auswirkt (BRILLANTI S et al., 1994). Die Überlegenheit der Kombinationstherapie ist seitdem durch umfangreiche Studien eindeutig belegt (POYNARD T et al., 1998; REICHARD O et al., 1998).

Mittlerweile wurde in Langzeitergebnissen die erhebliche bessere Wirksamkeit des PEG-IFN- α in Kombination mit Ribavirin gegenüber der Therapie mit Standard-IFN- α mit Ribavirin bewiesen. Bei Verwendung von pegylierten Interferonen kam es zu einer Verdopplung der anhaltenden Responderaten (HEATHCOTE EJ et al., 2000; ZEUZEM S et al., 2000, SCHIFFMANN ML et al., 1999).

Das Ziel einer antiviralen Therapie ist eine komplette Elimination des Virus. Unter einer Therapie zeigt die Kinetik der HCV-RNA verschiedene Verläufe: Kommt es nach Einleitung der Behandlung zu einem Abfall der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze und bleibt schließlich das für mindestens sechs Monate nach Therapieende nicht nachweisbar, spricht man von einer „Sustained Response“ (BERG T und HOPF U, 2001). Demgegenüber spricht man von einem „Breakthrough“, wenn es nach anfänglicher Response zu einem Wiederauftreten der HCV-Virämie unter Therapie kommt. Kommt es zu einem solchen Ereignis nach Therapieende spricht man von einem „Relapse“. Als „Nonresponder“ werden Patienten bezeichnet, die bis zum Therapieende nicht HCV-RNA-negativ werden.

In einer in unserem Institut angefertigten Dissertationsarbeit wurde eine eigene Klassifizierung unterschiedlicher Response-Typen entwickelt, wobei es hierbei insbesondere um die Kinetik innerhalb der ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn ging (THOMAS C et al., 2003). So wurde die Gruppe der Responder in „Initial Responder“ und „Delayed Responder“ unterteilt. Als Initial Responder wurden Patienten bezeichnet, die

unter Therapie einen initialen Abfall der HCV-Viruslast zeigten, der mindestens 2,5 log-Stufen betragen oder zu einem Abfall der Viruslast unter die Nachweisgrenze innerhalb von 48 Stunden führen musste. Bei Delayed Respondern kam es hingegen zu einem verzögerten Abfall der HCV-RNA und zunächst sogar zu einem Anstieg der Viruslast über das Ausgangsniveau.

Unter einer Interferon-basierter Therapie treten früh und regelhaft grippeähnliche Symptome auf. Diese umfassen Kopf-, Muskel- und Gliederschmerzen sowie Fieber. Diese Beschwerden treten bei 90-100 % der Patienten auf, häufig schon nach der ersten Injektion, sind harmlos und lassen sich gut mit Paracetamol therapieren. Als weitere Komplikationen in der ersten vier bis acht Wochen sind die hämatopoetischen Veränderungen, insbesondere die Interferon-induzierte Neutropenie, zu nennen, die bei 10 % der Patienten auftritt. Insgesamt erleiden gut die Hälfte der Patienten Blutbildveränderungen im Sinne einer Thrombozytopenie, Leukopenie oder Anämie (RUSSO MW et al., 2003; SOZA A et al., 2002). Vorbestehende hämatologische Erkrankungen gelten daher als Kontraindikation für eine Therapie mit Interferon- α .

Im weiteren Verlauf treten Nebenwirkungen weniger regelhaft auf; kaum ein Patient erleidet das volle Spektrum der häufigen Nebenwirkungen. Häufige Nebenwirkungen sind Magen-Darm-Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Bauchschmerzen), Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit, Kurzatmigkeit und Husten. Ebenfalls häufig sind dermatologische Komplikationen wie Exanthem, Juckreiz und Affektionen der Infektionsstelle sowie Alopezie (FRIED MW, 2002).

Zu den späten Nebenwirkungen (Woche 24 bis 48) gehören vor allem neurologische und psychiatrische Erkrankungen. Häufig kommt es zu Müdigkeit, Schlaflosigkeit, Reizbarkeit und Konzentrationsstörungen, depressive Episoden können sich in unterschiedlicher Intensität manifestieren, bei bis zu 15 % der Patienten kommt es zu schweren Depressionen bis hin zu suizidalen Gedanken und Suizidversuchen. Solche Komplikationen erfordern das unmittelbare Absetzen der Therapie (ZDILAR et al., 2000).

Ribavirin ist allgemein gut verträglich, jedoch kann es unter Ribavirin zu einer schweren Hämolyse mit Abfall des Hämoglobins unter 3g/dl kommen.

Die Ausprägung der Nebenwirkungen variiert sehr stark, so daß das Ausmaß der Belastung

für den einzelnen Patienten nicht vorhersehbar ist. In Abhängigkeit von der beruflichen Tätigkeit und dem Nebenwirkungsspektrum ist jedoch mit Arbeitsausfällen während der Therapie zu rechnen.

Die meisten Nebenwirkungen sind vollständig rückbildungsfähig, dauerhafte Schäden drohen vor allem dann, wenn die Therapie trotz aufgetretener schwerer Nebenwirkungen nicht rechtzeitig beendet wurde.

Als absolute Kontraindikationen für die Kombinationstherapie von IFN- α und Ribavirin gelten schwere Allgemeinerkrankungen, fortgeschrittene Leberzirrhose, psychische Erkrankungen, Leuko- oder Thrombopenien, Autoimmunerkrankungen sowie eine Schwangerschaft.

1.5. Prognose

Als primäres Ziel der Therapie einer chronischen HCV-Infektion gilt der fehlende Nachweis HCV-spezifischer RNA im Serum sechs Monate nach Therapieende mittels eines hochsensitiven molekularen Nachweisverfahrens. Der fehlende HCV-RNA-Nachweis im Serum korreliert mit einem negativen HCV-RNA-Nachweis im Lebergewebe (MC HUTCHINSON JG et al., 2001).

Die Überlegenheit der pegylierten Interferone gegenüber den Standard-Interferonen wurde bereits 2002 eindeutig dokumentiert. In einer 3-armigen zulassungsrelevanten Studie (FRIED MW et al., 2002) wurde:

- a) die Kombination Standard-Interferon (3*3 MIU/Woche für 48 Wochen) plus Ribavirin (1000-1200mg/Tag) gegen
- b) die Monotherapie mit Peg-Interferon- α 2a (180 μ g/Woche für 48 Wochen) plus Placebo bzw.
- c) die Kombination Peg-Interferon- α 2a (180 μ g/Woche für 48 Wochen) plus Ribavirin (1000-1200 mg/Tag) verglichen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die dauerhaften virologischen Ansprechraten in

der Gruppe der Standardkombinationstherapie bei 44 %, in der Gruppe der Monotherapie bei 29 % und in der Gruppe der Kombinationstherapie Peg-Interferon- α 2a plus Ribavirin bei 56 % lagen. Auch Patienten mit dem prognostisch ungünstigen Genotyp 1 erzielten in der Kombinationstherapie Peg-Interferon- α 2a plus Ribavirin signifikant bessere Ergebnisse als die Patienten, die Standardinterferon oder Peg-Interferon- α 2a als Monotherapie erhielten (FRIED MW et al., 2002).

In einer weiteren zulassungsrelevanten randomisierten Studie wurden die Therapiedauer für Peg-Interferon- α 2a (24 Wochen vs. 48 Wochen) sowie die Ribavirin-Dosierungen (800 mg/Tag vs. 1000-1200 mg/Tag) miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich bei Patienten mit HCV-Genotyp 1 die besten Ergebnisse bei einer Therapiedauer von 48 Wochen und hohen Ribavirindosierungen (1000-1200 mg/Tag). Bei Patienten mit HCV-Genotyp 2 oder 3 konnten hingegen keine Vorteile durch eine längere Therapiedauer oder höhere Ribavirindosierung evaluiert werden (HADZIYANNIS SJ et al., 2004).

Aus dieser Studie leitete sich die Empfehlung ab, die Therapiedauer von Patienten mit HCV-Genotyp 2 oder 3, bei einer Ribavirin-Dosierung von 800 mg/Tag, auf 24 Wochen zu begrenzen.

Die derzeitigen Empfehlungen zur Therapie der chronischen HCV-Infektion sehen ein diversifiziertes Therapiemanagement vor, welches sich aus den Daten der REPEAT-Studie ableitet (JENSEN DM et al., 2007). Die Therapie der chronischen Hepatitis C erfolgt derzeit mit einem pegylierten Interferon und gewichtsadaptiertem Ribavirin (KRONENBERGER B et al., 2009). Hierbei sind hohe Ribavirindosen anzustreben (12-15 mg/kg KG). Die Therapiedauer richtet sich nach dem HCV-Genotyp, der HCV-RNA-Konzentration am Beginn der Therapie und dem Virusabfall unter Therapie. Bei niedriger Ausgangsviruslast und raschem Abfall des Virus (Woche 4 negativ - d.h. rapid viral response „RVR“) ist eine Verkürzung möglich, bei langsamem Abfall der Viruslast kann hingegen eine Verlängerung sinnvoll sein (DI BISCEGLIE et al., 2008). Bei fehlendem Ansprechen zu Woche 12 (>30.000 IU HCV RNA /ml) bzw. 24 (noch positive RNA) sollte die Therapie beendet werden.

Die Etablierung prognostischer Parameter, durch welche man bereits vor Therapiebeginn eine Aussage bezüglich der virologischen Ansprechraten und der dauerhaften Heilungsraten machen kann, ist ein wesentliches Ziel der modernen HCV-Therapie und

stellt die Basis für individuelle Therapiestrategien dar.

Mittlerweile ist durch zahlreiche Studien belegt, daß dem HCV-Genotyp die größte prognostische Bedeutung hinsichtlich des Therapierfolgs zukommt (HADZIYANNIS SJ et al., 2004; MANNS MP et al., 2001). Durch eine moderne Kombinationstherapie von pegylierten Interferonen plus Ribavirin konnte man bei fast allen Patienten mit HCV-Genotyp 2 und 3 ein initiales Ansprechen und dauerhafte Heilungsraten von über 80 % erreichen, während die Therapie von Patienten mit HCV-Genotyp 1 nach wie vor ein Problem darstellt (FRANCOIS C et al., 2009; MANNS MP et al., 2000).

Weitere prognostische Faktoren für die Interferon-Therapie konnten in großen, internationalen Multicenter-Studien etabliert werden (MC HUTCHINSON JG et al., 1998; POYNARD T et al., 1998). Dabei wurden neben den HCV-Genotypen 2 und 3 folgende Faktoren als prognostisch günstig eingestuft:

1. Alter < 40 Jahre
2. Weibliches Geschlecht
3. HCV-RNA < 2 Mio. Kopien/ml (SuperquantTM von NGI) bzw. < 800.000 IU/ml
4. Geringer Fibrosegrad in der Leber

Obwohl all diese Parameter zwar eine Abschätzung des virologischen Therapieansprechens ermöglichen, war es doch bisher nicht möglich, eine verlässliche Aussage hinsichtlich der Response zu treffen. Mit dieser Fragestellung beschäftigte sich eine Promotionsarbeit in unserem Institut. In dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob die HCV-RNA-Frühkinetik in der Initialphase einer IFN- α /Ribavirin-Therapie einen suffizienten prognostischen Marker bezüglich des Therapieerfolgs darstellt. Durch engmaschige HCV-RNA-Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass bereits 24 Stunden nach initialer IFN- α -Applikation eine Differenzierung zwischen einem Response- bzw. Non-Response-Verhalten möglich ist. Ob jedoch ein anfängliches Response-Verhalten zu einem erfolgreichen Therapieausgang im Sinne einer Sustained Response führt, konnte mittels der HCV-RNA-Frühkinetik nicht sicher vorhergesagt werden (THOMAS C, 2003).

Daneben beschäftigten sich auch andere Arbeitsgruppen mit der prognostischen Potenz der viralen Kinetik. Es existieren mehrere Studien über die Vorhersehbarkeit eines dauerhaften Ansprechens, bzw. eines Non-Response, wobei derzeit Diskrepanzen bestehen, zu welchem

Zeitpunkt nach Therapieinitiierung frühestmöglich eine prognostische Aussage möglich ist (KUROSAKI M et al., 2010; DELTENRE P et al., 2009; IDREES M et al., 2009).

1.6. Das TT-Virus

Im Dezember 1997 wurde von japanischen Forschern ein neues DNA-Virus, das TT-Virus (TTV), im Serum eines Patienten (mit den Initialien T.T.) mit anikterischer selbstlimitierender akuter Posttransfusions-Hepatitis unklarer Ätiologie (Non-A-G) identifiziert (Nishizawa T et al., 1997). Im Folgenden konnten TTV-Sequenzen bei mehr als 45% der Patienten fulminanter Hepatitis oder chronischer Lebererkrankung und auch bei Patienten mit parenteralen Risikofaktoren (Hämodialyse, Patienten mit Hämophilie, i.v.-Drogenabhängige) gefunden werden (Okamoto H et al., 1998). Die Autoren folgerten, dass TTV neben GBV-C/HGV ein weiteres Kandidaten-Virus für akute und chronische Hepatitiden unklarer Ätiologie darstellen könnte.

TTV ist ein hüllenloses, Einzelstrang-DNA-Virus mit negativer Polarität, welches eine geschlossene zirkuläre DNA von 3.852 Nukleotiden Länge enthält, das für 2 offene Leserahmen von ca. 761-770 und 150-156 Aminosäuren kodiert. Das Virus hat einen Partikel-Durchmesser zwischen 30 und 50 nm (MUSHAHWAR IK et al., 1999). Takahashi et al. zeigten eine Ähnlichkeit von TTV mit dem Chicken Anaemia Virus (CAV), einem ehemals Circovirus und nun Circinovirus (Takahashi et al. 1998). Diese Ähnlichkeiten basierten auf den Arginin-reichen Regionen in den Open Reading Frames (ORF) beider Viren und auf Ähnlichkeiten in ihrer Genomstruktur (Miyata et al. 1999).

Das TT-Virus weist eine extrem große genetische Variabilität auf, so dass über 40 verschiedene Subtypen unterschieden werden. In der aktuellen Nomenklatur werden die TT-Viren zur Familie der *Anneloviridae* gezählt. Dabei werden die größeren TT-Viren Typ 1-28 dem Genus *Alphatorquevirus* zugeordnet, während die Minitypen Typ 1-9 zu den *Betatorqueviren* gerechnet werden.

1.7. α -GST

In der klinischen Routine wird die Leberzellintegrität durch Messung der Transaminasen, Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST), und die Leberfunktion durch Syntheseparameter wie Gerinnungsfaktoren, Cholinesterase und Bilirubin bestimmt. Zur Behandlung einer chronischen Hepatitis C ist dabei vor allem das Ausmaß einer hepatozellulären Schädigung von Bedeutung.

Die Enzyme ALT und AST sind jedoch als Marker nur bedingt geeignet. Dies liegt zum einen daran, daß insbesondere die ALT kein leberspezifisches Enzym ist, sondern auch in anderen Geweben wie Muskel, Herzmuskel und Blutgefäßen vorkommt. Der andere Nachteil dieser Marker ist ihre ungleiche Verteilung in der Leber: So ist die periportale Konzentration höher als die zentrilobuläre Konzentration. Da aber gerade die zentrilobulären Hepatozyten sehr anfällig für Schäden wie bei Transplantatabstoßung, viraler Hepatitis und chronisch aktiver Hepatitis sind, benötigt man einen Marker, der sehr spezifisch nur in der Leber vorkommt und dessen Konzentration in der periportalen und der zentrilobulären Region gleichmäßig ist.

All diese Eigenschaften verkörpert das Enzym α -Gluthation-S-Transferase (α -GST). Dieses zytosolische Enzym mit einem Molekulargewicht von 50.000 Dalton kommt in der Leber ubiquitär vor und besitzt mit einer Halbwertszeit von 90 Minuten einen weiteren Vorteil: Ein Wiederabfall des Enzyms lässt die Beendigung eines Leberzellschadens zeitlich sehr genau einordnen.

1.8. Fragestellung dieser Arbeit

In den zu Beginn dieser Arbeit (07/2004) bis dato durchgeführten Studien konnte für die Peg-IFN- α /Ribavirin- Kombinationstherapie eine Überlegenheit hinsichtlich des virologischen Ansprechens und der dauerhaften Viruselimination gegenüber anderer Therapie-Regime (Peg-IFN- α -Monotherapie; IFN- α /Ribavirin-Kombinationstherapie) gezeigt werden.

In der vorliegenden Dissertation sollten Patienten, welche ausschließlich mit Peg-IFN- α -2a/Ribavirin behandelt werden, mit einer Patientengruppe verglichen werden, welche zusätzlich am Tag 1 der Therapie einmalig das freie IFN- α erhält. Ziel dieser einmaligen Gabe war die möglichst rasche und vollständige Blockade der Virusreplikation. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die in der ersten HCV-Kinetik-Studie unseres Instituts (s.o.) erarbeitete Prognostik auch bei Patienten bei Induktionstherapie anwendbar ist. Aufgrund der Pharmakokinetik und des damit verbunden langsamen Anflutens des Peg-IFN- α war dies bei einer Therapie mit Peg-IFN- α /Ribavirin nicht zu erwarten. In diesem Zusammenhang sollte auch geprüft werden, ob durch das rasche Anfluten des Standard-Interferons die virologischen Ansprechraten und die dauerhaften Heilungsraten erhöht werden können.

Ebenfalls zu prüfen war die Kinetik des HCV-Core-Antigens sowie der HCV-RNA/HCV-Core-Protein-Quotient und deren prognostische Bedeutung. In der ersten HCV-Kinetik-Studie unseres Instituts wurde die Hypothese aufgestellt, dass der HCV-RNA/HCV-Core-Protein-Quotient als prognostischer Marker des Response-Verhaltens zu betrachten sei (THOMAS C, 2003). Dies sollte in dieser Arbeit durch weiterführende Untersuchungen bekräftigt werden.

Weiterführend ist auch die Fragestellung, ob der durch α -GST angezeigte initiale Hepatozytenzerfall nur bei der Applikation von schnell anflutendem Interferon oder auch bei pegyliertem Interferon allein auftritt. Möglicherweise ist der initiale Hepatozytenzerfall prognostisches Zeichen einer erfolgten T-Zell-Aktivierung und damit Hinweis auf eine beginnende Elimination virusinfizierter Zellen.

Als Nebenaspekt dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit eine vorliegende Infektion mit dem TT-Virus sowie die Höhe der TT-Viruslast eine Rolle für die virologische Response des HCV spielt und ob das TT-Virus selber auf eine Interferon-Therapie reagiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenseren

Die Art der Proben ist unter im Kapitel 3: Studiendesign beschrieben. Die verwendeten Plasmaproben wurden in unserem Institut in 1 ml-Aliquots anonymisiert und nach Patientenummer und Abnahmezeitpunkt geordnet bei -20° C gelagert.

2.1.2. HCV-RNA-Referenzplasma

Für die HCV-RNA-Quantifizierung mittels Real-time-RT-PCR wurde ein Vergleichsplasma mit einer bekannten HCV-RNA-Konzentration benötigt. Das interne Referenzplasma, das für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, wurde aus einem HCV-positiven Plasma des Blutspendedienstes Linz/Österreich durch Verdünnung mit dem Plasma eines HCV-negativen Spenders hergestellt, am offiziellen WHO-Standard (NIBSC 96/790) und am HCV-Standard #75/98 des Paul-Ehrlich-Instituts geeicht und auf 10⁶ IU/ml eingestellt.

2.1.3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, welche in der vorliegenden Arbeit als Primer für die Real-time-RT-PCR verwendet wurden, werden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert und wurden vor Benutzung durch Verdünnung mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 10 pMol/μl eingestellt. Die Hybridisierungssonden kamen von der Fa. TibMolBiol, Berlin und wurden lyophilisiert bei 4° C unter Lichtschutz gelagert. Vor ihrer Benutzung wurden sie mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 8 pMol/μl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die thermodynamische Schmelztemperatur T_m [°C] wurde unter Verwendung der Software LightCycler Probe Design Version 1.0[©] (Idaho Technology Inc.,

USA, 2001) berechnet.

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Position
NCR-s	5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA	59,8	193- 175
NCR-as	5'-CTTAAGGTTT TAGGATTCGTGCTCAT	57,7	24- 1
Hybridisierungs- sonden	Sequenz	T_m [°C]	Position
HCV-NCR-LR	5'-LC Red640-TGCCTGATAGGGTGCTTGCA GT-P	65,9	52- 30
HCV-NVR-FL	5'-GGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTA-FL	65,3	75- 54

2.1.4. Chemikalien

➤ RNase-freies Wasser:

Zur Herstellung des RNase-freien Wassers werden zu 100 ml Aqua bidest. 0,1% DEPC (Pyrokohlensäurediäthylester 97%, Fa.Aldrich, Katalognummer 15,922-0/25) hinzugefügt und nach Inkubation über Nacht bei 37 C zweimalig autoklaviert. Nach Aliquotierung erfolgt die Lagerung bei 4° C.

2.1.5. Kits und Assays

Biotrin HEPKIT-Alpha

Biotrin, Dublin, Irland

Human Glutathion-S-Transferase-Alpha

Kat.Nr. BIO60HEPA

LightCycler-RNA Amplification Kit for Hybridization Probes

Roche Diagnostics

Kat.Nr.2015145

LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I

Roche Diagnostics

Kat.Nr.03515869001

QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden Kat.Nr. 52906
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden Kat.Nr. 28706
ARCHITEKT HCV Ag Reagent Kit	ABBOTT Japan Co.,Tokio 8100/6L47
ARCHITEKT HCV Ag Controls	ABBOTT,JapanCo., Tokio 8100/6L47-10

2.1.6. Geräte

Incubator/Shaker iEMS	Thermo Labsystems, Franklin, USA
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg
Waschgerät für Mikrotiterplatten Columbus	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Incubator Solo HT	Thermo Labsystems, Franklin, USA
Photometer für Mikrotiterplatten LP400	Pasteur, Diagnostics
ARCHITEKT i2000/SR	ABBOTT, Diagnostics Division

2.2.Methoden

2.2.1. HCV-RNA-Extraktion

Zur Extraktion der HCV-RNA wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit verwendet und die Extraktion nach dem QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol auf Seite 18/19 des Handbuchs durchgeführt. Dabei wurde ein Schritt des Protokolls von uns geändert, um Salze und Puffer im PCR-Ansatz zusätzlich zu minimieren: Wir setzten im Schritt 10 anstelle des Elutionspuffers 60µl RNase-freies Wasser ein und zentrifugierten anschließend bei $20.000 \times g$ statt der im Protokoll empfohlenen $6000 \times g$. Die HCV-Extrakte der Seren und des Standards wurden stets unmittelbar nach der Extraktion mittels Real-time-RT-PCR gemessen und quantifiziert. Die Überstände wurden bei -70°C eingefroren und gelagert.

2.2.2. Real-time-RT-PCR

Die modernste Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren ist die Real-time-PCR als eine Weiterentwicklung der Standard-PCR. Bei der Standard-PCR ist der quantitative Nachweis eines Genoms erst nach Beendigung der PCR durch Endpunkttitration möglich. Bei der Real-time-PCR misst man hingegen nach jedem Zyklus ein Signal. Zudem ist bei Anwendung von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-vermittelnden Sonden nach Beenden der Amplifikation ein Spezifitätsnachweis des amplifizierten Produkts durch eine Schmelzkurvenanalytik möglich.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf Fluoreszenzdetektion, wobei man als sequenzunabhängige Detektionssubstanz vor allem SYBR[®]Green einsetzt. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der an Doppelstrang-DNA spezifisch bindet und bei Anregung durch Licht einer definierten Wellenlänge fluoresziert. Der Farbstoff fluoresziert nur in DNA-gebundener Form, so daß die Fluoreszenz proportional zur gebildeten Menge an Doppelstrang-DNA ist. Der Vorteil der SYBR Green Methode ist die universelle

Verwendbarkeit, weil jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann, nachteilig wirkt sich diese Unspezifität jedoch dadurch aus, daß es nicht möglich ist, zwischen korrektem Produkt und Artefakten zu unterscheiden.

Aus diesem Grund nutzt man bei spezifischen Fragestellungen oft den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET): Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und strahlt die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Das Anregungsspektrum und das Emissionsspektrum sind dabei für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff spezifisch. Statt eines Fluorochroms kann man nun aber auch zwei Fluorochrome verwenden, wobei das zweite Fluorochrom durch das Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms angeregt wird. Die Energie, welche bei der Anregung des ersten Fluorochroms entsteht, wird also nicht in Form von Licht abgestrahlt, sondern direkt an das zweite Fluorochrom abgegeben, welches dadurch ebenfalls angeregt wird und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, das anschließend detektiert werden kann. Das Fluorochrom 1 bezeichnet man als Donor, das Fluorochrom 2 als Akzeptor.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hybridisierungssonden verwendet, die nur Signale erzeugen, wenn sie an definierten Sequenzen gebunden sind. Hierzu verwendeten wir mit Farbstoffen markierte Oligonukleotide, die so hergestellt wurden, dass sie entsprechend der Zielsequenz nebeneinander an das Amplifikat binden. Dabei trägt ein Nukleotid Fluorescein am 3'-Ende als Donor, das andere am 5'-Ende LightCycler-Red 640 als Akzeptorfarbstoff.

Durchgeführt wurde die Quantifizierung mit dem LightCycler-System der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim. Die PCR erfolgt hier in sehr kleinen Volumina von maximal 25 µl in Borsilikat-Glaskapillaren, die über Zentrifugation gefüllt werden müssen. Die Kapillaren sitzen in einem Karusell mit 32 Positionen und werden mit Luft beheizt und gekühlt. Durch das geringe Volumen und die vergleichsweise große Oberfläche der Glaskapillaren ist eine schnelle Temperaturübertragung von bis zu 20°C/Sekunde möglich, so dass eine PCR-Reaktion mit 40 Zyklen in etwa 40 Minuten durchgeführt werden kann.

Zur Detektion emittiert eine LED (light-emitting diode) Blaulicht der Wellenlänge 470nm durch welches das Fluorescein angeregt wird, das wiederum ein Fluoreszenzsignal abgibt. Dieses regt den Akzeptorfarbstoff LightCycler-Red 640 an, dessen Emissionssignal durch

die optische Einheit des Lightcyclers erfasst wird. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge des Amplifikats. Zur exakten Quantifizierung wurde in jeder Reaktion die Verdünnungsreihe des unter 2.1.2. beschriebenen Standards mitgeführt, anhand dessen man eine Standardkurve generieren und so die exakte Konzentration der Amplifikate messen konnte.

Für die HCV-RNA-Quantifizierung wurde das LightCycler-RNA Amplifikation Kit Hybridization Probes (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Seren der Patienten wurden stets unmittelbar nach der Extraktion und immer in einem PCR-Lauf gemessen. Ein PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 4 µl LightCycler-RT-PCR-Reaction Mix Hybridization Probes
- 3 µl Magnesiumchlorid (25 mM)
- 1 µl Sense-Primer (NCR-s) (=10 pMol)
- 2 µl Antisense-Primer (NCR-as) (=10 pMol)
- 1 µl HCV-NCR-LR (=8 pMol)
- 0,5 µl HCV-NCR-FL (=4 pMol)
- 0,4 µl LightCycler-RT-PCR-Enzym Mix
- 0,1 µl RNase-freies Wasser
- 8 µl Template

Tabelle 1: Protokoll der Real-time-RT-PCR zur HCV-RNA-Quantifizierung

Abschnitt	Zyklen	Teilschritte	Temp.[°C]	Dauer [s]	Slope [°C/s]
Reverse Transkription	1		55	720	
Denaturierung der RT	1		95	30	
Amplifikation	45	Denaturierung	95	3	20

		Annealing Fluoreszenzmessung bei 640nm	65-54	7	1
		Elongation	72	14	2
Schmelzen	1	Denaturierung	95	10	20
		Annealing	50	15	20
		Fluoreszenzmessung nach jeder Temperaturerhöhung um 0,1°C	50-90	0	0,1
Kühlen	1		40	60	20

Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der Fluoreszenzmessungen und der Analyse der Schmelzkurven: Eine Hintergrundfluoreszenz ist schon von Beginn der Reaktion zu messen. Solange jedoch wenig PCR-Produkt vorhanden ist, lässt sich keine Zunahme der Fluoreszenz messen. Nach mehreren Amplifikationszyklen steigt die Menge des PCR-Produkts und somit auch die Fluoreszenz exponentiell an. Erst gegen Ende des Laufs stellt sich eine Plateauphase ein, da nun alle fluoreszierenden Moleküle bereits an Amplifikat gebunden sind. Um nun anhand dieser Daten die Menge an extrahierter RNA zu errechnen geht man folgendermaßen vor: Zunächst erstellt man eine Graphik, in der die exponentielle Zunahme auf die Zahl der abgelaufenen Zyklen bezogen wird. Nun legt man eine Regressionsgerade durch bestimmte Punkte der Fluoreszenzfunktion. Der Punkt, an dem die Regressionsgerade die Ordinate schneidet, bezeichnet man als „*crossing point*“. Wieviele Punkte auf der Regressionsgeraden liegen (*Fit points*), werden vom Benutzer selbst definiert. Dabei gilt es zu beachten, daß die *Fit points* nur im exponentiellen Bereich der Signalfunktion liegen dürfen, da ansonsten der *crossing point* in den Bereich niedrigerer Zykluszahlen verschoben wird.

Damit nun die so ermittelten Schnittpunkte mit der Zeitachse in Beziehung zur vorhandenen Nukleinsäure-Konzentration gesetzt werden können, wurde stets ein Standard mit bekannter Konzentration von 10^6 IU/ml und einer entsprechenden Zehner-Verdünnungsreihe mitgeführt. Auch hier wurden die *crossing points* ermittelt. Der *crossing point* des Standards sollte dabei im Bereich von Zyklus 21 liegen. Anhand der bekannten

Standard-Konzentrationen und der *crossing points* der Proben konnte nun durch mathematische Berechnung die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe ermittelt werden. Die Schmelzkurvenanalyse dient dann dem Spezifitätsnachweis des Amplifikats. Hierzu erfolgen nach dem letzten PCR-Zyklus eine weitere Denaturierung sowie ein Annealing. Dabei lagern sich die Hybridisierungssonden wieder an ihre spezifischen Positionen an. Nun wird die Temperatur schrittweise um 0,1°C pro Sekunde erhöht, wobei mit jeder Temperaturerhöhung auch die Fluoreszenz gemessen wird. Bei einer bestimmten, für das Amplifikat spezifischen Temperatur, kommt es nun zur Dissoziation des Doppelstrangs in Einzelstränge und die Fluoreszenz nimmt schlagartig ab. Die Lightcycler-Software trägt nun automatisch die negative erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur (dF/dT) auf, so dass als Maximum der Wendepunkt der Schmelzkurve erscheint. Mit dieser Schmelzkurvenanalytik lässt sich die Spezifität des Amplifikats nachweisen, da die Hybridisierungssonden nicht an Amplifikate binden, die für sie nicht spezifisch sind. Sie können jedoch während des Annealings auch binden, wenn einzelne Fehlpaarungen vorliegen. In diesem Fall dissoziiert der Doppelstrang aber schon bei niedrigeren Temperaturen auseinander, so daß sich in der Schmelzkurvenanalyse ein niedrigerer Schmelzpunkt ergeben würde.

Die Quantifizierung der TTV-DNA wurde nach einem etablierten Protokoll durchgeführt, welches in einer in unserem Hause angefertigten Dissertationarbeit (Bruns J, 2011) beschrieben ist.

2.2.4. α -Glutathion-S-Transferase-Assay (α -GST)

Zur Quantifizierung des α -Glutathion-S-Transferase-Gehalts der Patientenseren verwendeten wir das Biotrin HEPKIT-Alpha (Biotrin, Dublin). Hierbei handelt es sich um einen quantitativen Enzymimmunoassay. Bei der Testdurchführung wurde schrittweise verdünntes Serum, Enzymkonjugat und Substrat auf eine mit α -GST beschichtete Mikroassayplatte gegeben. Die anschließend bei 450 nm gemessene Extinktion ist proportional zur vorhandenen α -GST Menge im untersuchten Serum. Der ELISA wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Vorbereitung der Reagenzien	Herstellung einer Waschlösung durch 20fache Verdünnung des mitgelieferten Waschkonzentrats
	Herstellung einer Verdünnungsreihe der α -GST
	Eichlösung
	Verdünnung des Konjugats im Verhältnis 1:50 Verdünnung der Serumproben im Verhältnis 1:4
2. Inkubation der Proben	Je 100 μ l verdünnte Proben, bzw. Standards in die Mikroassaynapfchen geben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Plattenschüttler inkubieren.
3. Inkubation des Konjugats	Nach dem Waschen jeweils 100 μ l Konjugat(Napf hinzugeben und für weitere 30 Minuten im Plattenschüttler inkubieren.
4. Farbentwicklung	Jeweils 100 μ l Substrat/Napf hinzugeben und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz für genau 15 Minuten inkubieren.
5. Stop und Messung	Die Reaktion mit 100 μ l Stopplösung/Napf stoppen und sofort bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm messen.

Der Test erfäßt α -GST-Konzentrationen von 0,25-200 μ g/l, wobei Werte unter 7,5 μ g/l als normal gewertet werden können. So ergab eine Analyse von 219 Blutspenderproben laut Herstellerangaben, daß bei 50% der Proben Werte unter 1,2 μ g/l und bei 95% Werte unter 7,5 μ g/l gemessen wurden.

2.2.5. HCV-Core-Antigen-Assay

Zur Bestimmung des Gehalts an HCV-Core-Antigen der Seren verwendeten wir den ARCHITEKT[®] HCV Ag Assay der Fa. Abbott. Hierbei handelt es sich um einen zweistufigen Immunoassay, der auf der Chemielumineszenz Mikropartikel Immunoassay-Technologie zur quantitativen Bestimmung des Core-Antigens in humanem Serum oder Plasma beruht.

Im Vorbehandlungsschritt wird zunächst Probenmaterial mit den

Vorbehandlungsreagenzien 1 und 2 vermischt. Anschließend wird die so vorbehandelte Probe mit den Anti-HCV beschichteten Mikropartikeln und der spezifischen Assay-Verdünnungslösung kombiniert. Liegt nun HCV-Core-Antigen in der Probe vor, dann bindet dies an die Anti-HCV beschichteten Mikropartikel. Nach einem Waschschrift wird im nächsten Schritt Anti-HCV-Konjugat hinzu gegeben, an welches Acridinium Ester gebunden ist. Dieser Ester besitzt eine organische Ringstruktur, geht durch Oxidation in einen energetisch angeregten Zustand über und kehrt unter Energiefreisetzung in seinen Grundzustand zurück, wobei Licht der Wellenlänge 430nm emittiert wird.

Nach einem weiteren Waschschrift wird dem Reaktions-Mix wird zunächst Pre-trigger-Lösung und dann Trigger-Lösung zugefügt. Die Pre-Trigger-Lösung dient der Lösung des Konjugats von den Mikropartikeln und enthält zur Signalverstärkung Wasserstoffperoxid. Die Trigger-Lösung enthält Natriumhydroxid, welches das alkalische Milieu für die Lichtreaktion erzeugt und Triton, das Micellen zur Signalverstärkung bildet.

Die nun folgende Chemilumineszenz-Reaktion wird in RLE (relative Lichteinheiten) gemessen. Hierzu misst der im Gerät integrierte Photomultiplier vor der Zugabe der Trigger-Lösung die Hintergrundintensität. Nach Zugabe der Trigger-Lösung startet die Chemilumineszenz-Reaktion, bei der Photonen emittiert werden. Diese werden in der Lichtröhre bei einer Wellenlänge von 430nm gebündelt und dann zum Photomultiplier weitergeleitet. Dieser leitet die Daten zum Rechner weiter, wo die Summe der Signale über einen definierten Zeitraum als RLE angegeben wird.

Die Konzentration an HCV-Core-Antigen in der Probe wird schließlich anhand einer ARCHITEKT HCV Ag Kalibrationskurve bestimmt. Ist die Konzentration größer als 3,0 fmol/l, dann gilt die Probe als positiv für HCV-Core-Antigen.

2.2.6. Statistische Auswertung

Für die Datenverarbeitung wurde das Programm Excel 2007® (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) verwendet, die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism® für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA; Version 4.02). Alle Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler (mean±SEM) angegeben. Die statistische Analyse von zwei Einzelwerten erfolgte mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben.

Dichotome Werte wurden mit dem Fisher's exact Test und kontinuierliche Werte mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon Rang-Summen-Test analysiert.

Als signifikanter Unterschied wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ im zweiseitigen Test angesehen.

3. Studiendesign

In dieser Studie wurden Patienten mit einer chronischen Hepatitis C in Form einer HCV-Monoinfektion untersucht. Eine Hepatitis-Ursache anderer Genese sowie Koinfektionen mit HBV oder HIV galten als Ausschlusskriterien. Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten beider Geschlechter mit einem Alter zwischen 18 und 70 Jahren. Vor Therapiebeginn war eine Leberpunktion obligat, um eine fortgeschrittene Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom auszuschließen. Insgesamt nahmen 30 Patienten an der Studie teil, das Patientenkollektiv setzt sich aus elf Frauen und 19 Männern mit einem Durchschnittsalter von 39,16 Jahren zusammen. Eine Gruppe von 16 Patienten (Therapiegruppe A) erhielt eine Peg-IFN- α /Ribavirin-Kombinationstherapie (PEGASYS®: 180 μ g/ml, Fertigspritze; COPEGUS®: Filmtabletten zu je 200mg Ribavirin, ROCHE), eine zweite Gruppe von 14 Patienten erhielt zusätzlich eine einmalige Applikation von IFN- α (ROFERON®; 18 Mio I.E.; ROCHE) (Therapiegruppe B).

Die Patienten mit HCV-Genotyp 1 erhielten Peg-Interferon- α 2a mit einer Wochendosis von 1,5 μ g/kg KG und eine hohe Ribavirindosis mit 1000-1200 mg/Tag über 48 Wochen. Patienten mit HCV-Genotyp 2 oder 3 hingegen erhielten Peg-Interferon- α 2a mit gleicher Wochendosis sowie Ribavirin mit einer Tagesdosis von 800mg über 24 Wochen.

Den Studienteilnehmern wurde nach folgendem festgelegtem Schema Blut entnommen: Unmittelbar vor der ersten Interferon-Applikation sowie jeweils 2, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach Therapiebeginn. Im weiteren Verlauf wurden zunächst nach einer Woche, dann nach zwei Wochen und vier Wochen, danach in vier-wöchentlichen Abständen über 6 Monate bei Genotyp 2 und 3, über 12 Monate bei Genotyp 1 und 4 Routinekontrollen vorgenommen. Im Sinne eines Follow-Ups erfolgte eine weitere Therapiekontrolle sechs Monate nach Therapieende.

Die Serumproben wurden dann in unserem Institut anonymisiert, aliquotiert und nach Patientenummer und Einsendezeitpunkt bei -20°C gelagert.

Die Genotypisierung erfolgte durch die diagnostische Abteilung (Inno-LiPa HCV II, Innogenetics) unseres Instituts und ergab folgendes Verteilungsmuster: In 14 Fällen lag ein Genotyp 1a, in 4 Fällen ein Genotyp 1b vor. Bei 10 Patienten wurde ein Genotyp 3a diagnostiziert, die Genotypen 2 und 4 waren mit jeweils einem Patienten repräsentiert.

Tabelle 1: Verteilung der Genotypen vor Studienbeginn

	Genotyp 1a	Genotyp 1b	Genotyp 2b	Genotyp 3a	Genotyp 4
Patienten (n)	14	4	1	10	1
Patienten (%)	46,66	13,33	3,33	33,33	3,33

Bei zwei Patienten (Genotyp 3a und Genotyp 4) war zum Zeitpunkt $t=0$ kein HCV-RNA-Nachweis mehr möglich. Diese Patienten haben offensichtlich zwischen der Diagnosestellung und dem Therapiebeginn spontan das Virus eliminiert (Spontan Konverter). Sie wurden zwar in die Studie aufgenommen, fallen jedoch aufgrund der schließlich nicht indizierten Therapie bei der Bewertung des Therapieerfolgs heraus.

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Gießen genehmigt (Ethiknummer 21/03).

4. Ergebnisse

Mittelpunkt unserer Untersuchungen war die Quantifizierung der HCV-RNA, insbesondere in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn. Weiterhin untersuchten wir die Entwicklung des HCV-Core-Antigens und verglichen die Kinetiken der HCV-RNA und des HCV-Core-Antigens in der Initialphase der Therapie. Um den Grad der Leberzellschädigung zu erfassen wurde als sensitiver Marker der Gehalt an α -Gluthation-S-Transferase in den Serumproben gemessen.

Schließlich wurde die TTV-DNA in allen Serumproben quantifiziert, um zu überprüfen, ob einerseits andere Viren, die in Zusammenhang mit chronischen Hepatitiden gebracht werden, ebenfalls auf Interferon reagieren und ob andererseits die initiale TTV-Viruslast oder das TTV-Response-Verhalten in Zusammenhang mit dem Response-Verhalten des HCV oder der Prognose einer HCV-Infektion in Zusammenhang steht.

4.1. HCV-RNA-Frühkinetik

Zur Beurteilung des Therapieerfolgs einer Interferon/Ribavirin-Therapie bei chronischer HCV-Infektion dient vor allem die HCV-RNA-Frühkinetik, das heißt der Abfall der Viruslast in den ersten 48 Stunden nach Interferon-Applikation. Hierbei unterscheidet man gemäß einer von THOMAS C und SCHÜTTLER CG vorgeschlagenen Nomenklatur zwischen Initial Responder, Delayed Responder und Non Responder.

Als Initial Responder bezeichnet man Patienten, die unter Interferon-Therapie einen unmittelbaren Abfall der Viruslast zeigen, wobei der Abfall der Viruslast mindestens 2,5 log-Stufen beträgt oder aber die HCV-RNA-Viruslast nach 48 Stunden unter 100 IU/ml liegt (Thomas C, 2003).

Der Begriff des Delayed Responders beschreibt einen verzögerten Abfall der HCV-RNA bei gegebener virologischer Response. Im Gegensatz zum Initial Responder kommt es beim Delayed Responder zu einem Anstieg der Viruslast über das Ausgangsniveau, was erst nach Erreichen eines Peaks in einen Abfall umschlägt.

Als Non-Responder wurden diejenigen Patienten bezeichnet, die 48 Stunden nach Interferon-Applikation kein oder nur unzureichendes virologisches Response-Verhalten

zeigten. Da (s. u.) alle so definierten Non-Responder auch über die gesamte Zeit Non-responder blieben, ergibt sich kein Konflikt mit der üblichen Nomenklatur.

In den folgenden Tabellen sind die beiden Therapiegruppen nach ihrem Response-Verhalten und nach einzelnen Genotypen aufgeteilt und einander gegenübergestellt (Tabelle 2-6).

Tabelle 2: Response-Verhalten aller 30 Patienten

	<u>Patienten (n)</u>	<u>Patienten (%)</u>
Initial Responder	7	23,33 %
Delayed Responder	15	50 %
Non Responder	6	20 %
RNA-Konverter	2	6,6 %

Tabelle 3: Response-Verhalten nach Therapiegruppe

	Gruppe A	Gruppe B	p-Wert
Initial Responder	1	6	p< 0,05
Delayed Responder	9	6	p= n.s.
Non Responder	5	1	p< 0.05
Gesamt	15	13	

Tabelle 4: Response-Verhalten der Therapiegruppe A geordnet nach Genotypen

<u>Genotyp</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Initial Responder</u> <u>[n]</u>	<u>Initial Responder</u> <u>[%]</u>	<u>Delayed Responder</u> <u>[n]</u>	<u>Delayed Responder</u> <u>[%]</u>	<u>Non Responder</u> <u>[n]</u>	<u>Non Responder</u> <u>[%]</u>
1a	5	-	-	1	20 %	4	80 %
1b	3	-	-	3	100 %	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-
3a	7	1	14,29 %	5	71,42 %	1	14,29 %

Tabelle 5: Response-Verhalten der Therapiegruppe B (geordnet nach Genotypen)

<u>Genotyp</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Initial</u>	<u>Initial</u>	<u>Delayed</u>	<u>Delayed</u>	<u>Non</u>	<u>Non</u>
		<u>Responder</u>	<u>Responder</u>	<u>Responder</u>	<u>Responder</u>	<u>Responder</u>	<u>Responder</u>
		<u>[n]</u>	<u>[%]</u>	<u>[n]</u>	<u>[%]</u>	<u>[n]</u>	<u>[%]</u>
<u>1a</u>	7	1	14,3 %	5	71,4%	1	14,3%
<u>1b</u>	3	2	66,6%	1	33,3	-	-
<u>2b</u>	1	1	100%	-	-	-	-
<u>3a</u>	2	2	100%	-	-	-	-

Zusammenfassend stellten wir fest, dass bis auf eine Ausnahme alle Patienten mit Response, sei es Initial-Response oder Delayed-Response, auch eine anhaltende Elimination des Virus im Sinne einer Sustained Response zeigten. Lediglich bei einem Patienten (Patient 3, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe A) der ein Delayed Response-Verhalten zeigte, kam es im weiteren Verlauf zu einem Breakthrough. In Therapiegruppe B zeigte sich signifikant häufiger ein Initial-Response-Verhalten als in Therapiegruppe A. Besonders bemerkenswert ist, dass die Rate an Non-Respondern in Therapiegruppe B signifikant niedriger war als in Therapiegruppe A (Tabelle 3)

Die Patienten hingegen, welche nach 48 Stunden als Non-Responder klassifiziert wurden, zeigten auch im weiteren Therapieverlauf keine Elimination des HCV.

4.1.1. Initial Responder

Im folgenden Abschnitt sind die HCV-RNA-Frühkinetiken aller sieben Patienten mit einem Initial Response-Verhalten dargestellt (Abbildung 1-7). Bei allen Initial Respondern stellten wir einen unmittelbaren Abfall der HCV-RNA-Konzentration nach Therapiebeginn fest. Der Abfall muss dabei laut unserer Definition mindestens 2,5 log-Stufen betragen oder die HCV-Viruslast muss 48 Stunden nach Therapiebeginn unter der Nachweisgrenze liegen (THOMAS C, 2003). Einige Patienten, welche wir der Gruppe der Initial Responder zuordneten, zeigten in der ersten Stunden nach Therapiebeginn trotz initial deutlichem Abfall der Viruslast einen ausgeprägten Wiederanstieg der HCV-RNA-Konzentration (Patienten 4, 30). Maßgeblich für die Einteilung in ein Initial-Response-Verhalten gegenüber einem Delayed Response-Verhalten ist die Höhe eines eventuellen Wiederanstiegs der Viruslast: Steigt die Viruslast unter Therapie über einen Wert, der den Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ überschreitet, so handelt es sich um ein Delayed Responder.

Insgesamt waren alle Patienten dieser Gruppe nach Therapieende HCV-RNA-negativ und blieben dies auch in den Nachbeobachtungen bis sechs Monate nach Therapieende.

Zur besseren Vergleichbarkeit wählten wir in den folgenden Graphiken eine einheitliche Darstellung: Für jeden Patienten wurde eine halblogarithmische Darstellung der HCV-RNA-Kinetik der ersten 48 Stunden angefertigt. Die Skalierung der Ordinate beginnt 1000 IU/ml und reicht bis 10 Millionen IU/ml. Zusätzlich wurde in einigen ausgesuchten Fällen eine lineare Darstellung der Viruskinetik angefertigt, um den individuellen Verlauf präziser darstellen und insbesondere bei niedriger Viruslast den Abfall der HCV-RNA besser zeigen zu können. Für die linearen Darstellungen wurden die Skalierungen der Ordinate dem individuellen Verlauf angepasst.

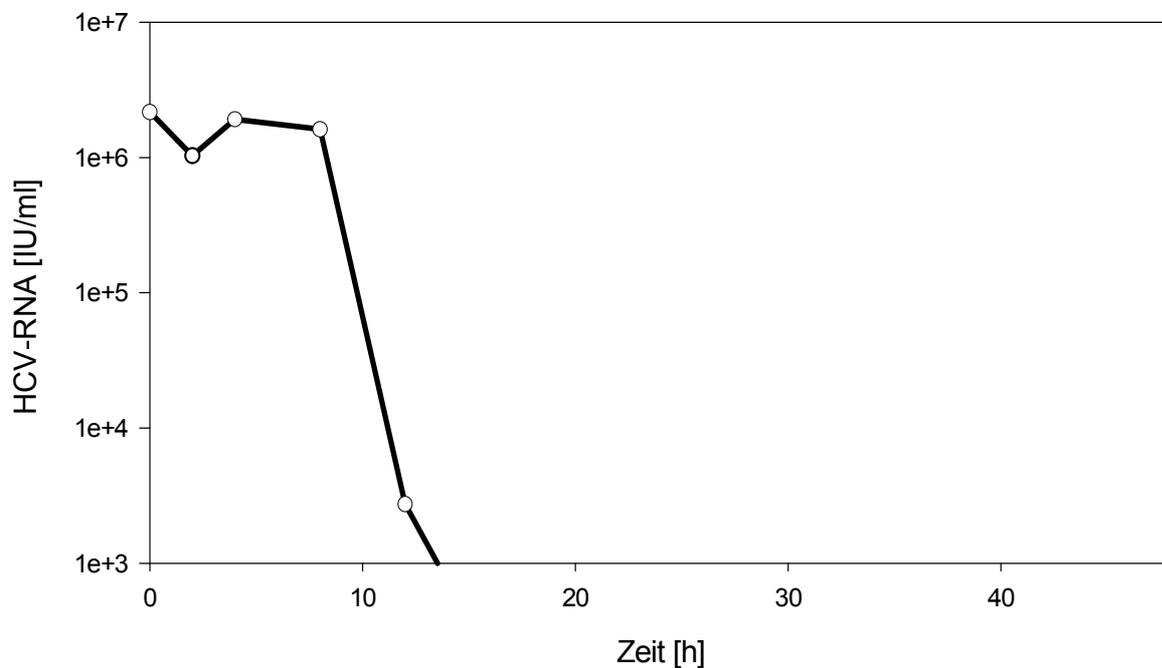


Abbildung 1: Patient 5, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

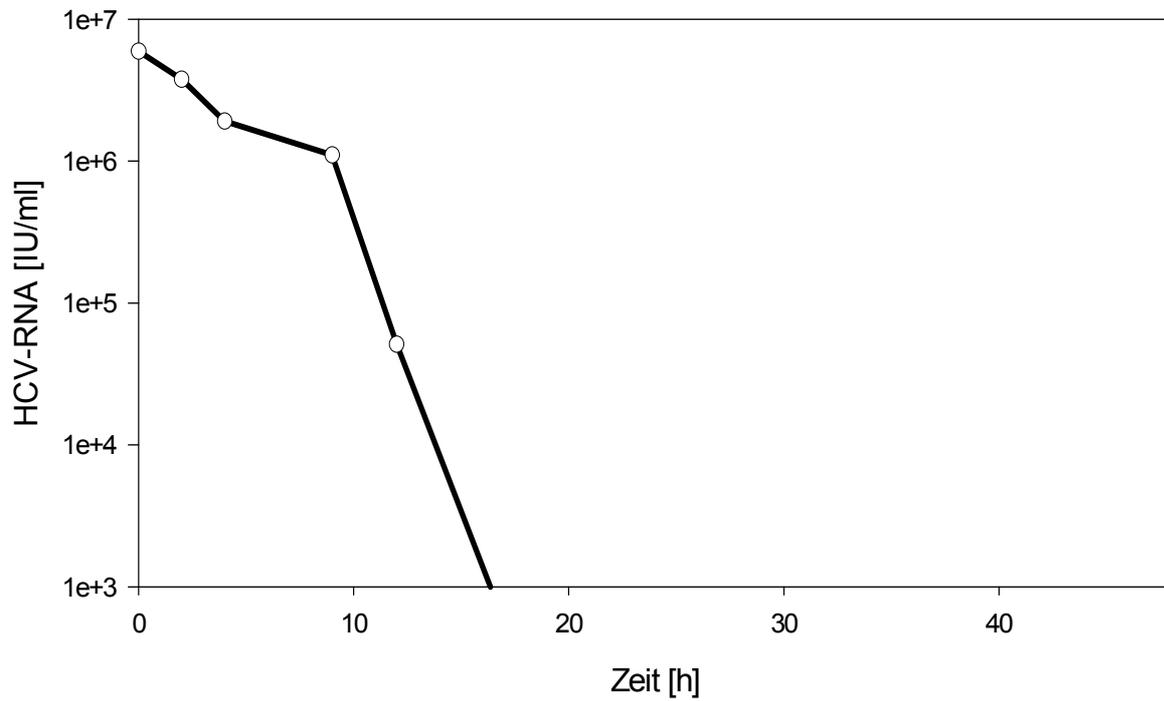


Abbildung 2: Patient 8, männlich, Genotyp 2b, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

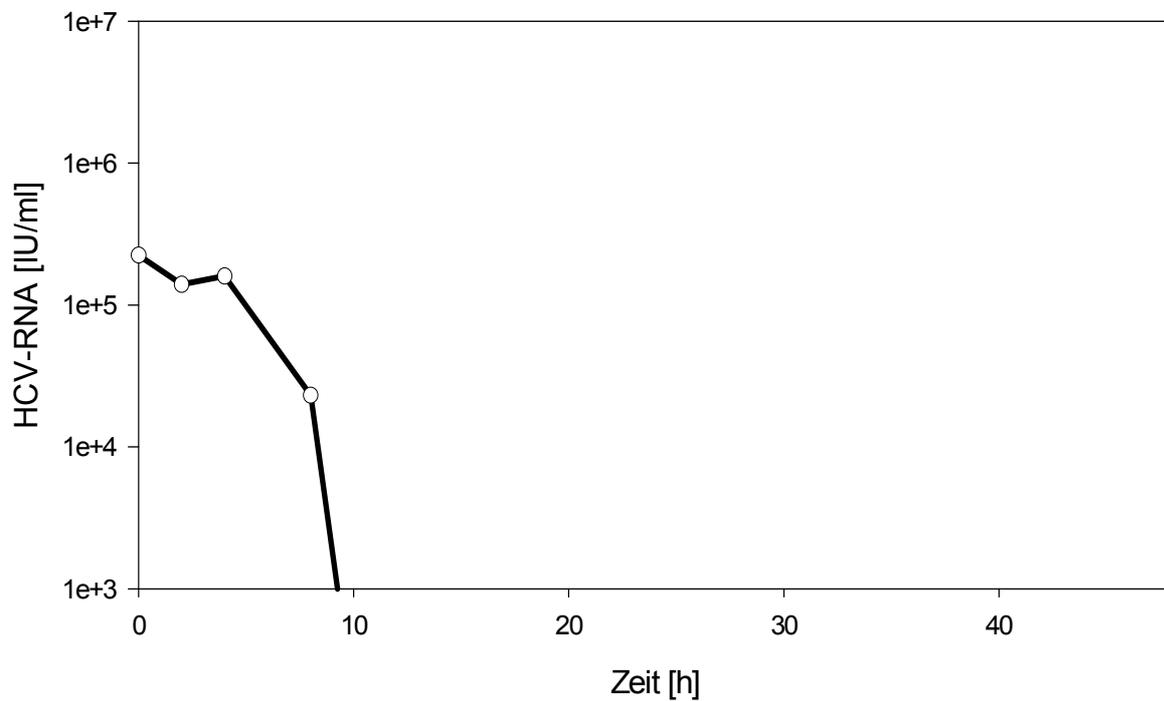


Abbildung 3a: Patient 10, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung, Breakthrough nach 5 Monaten.

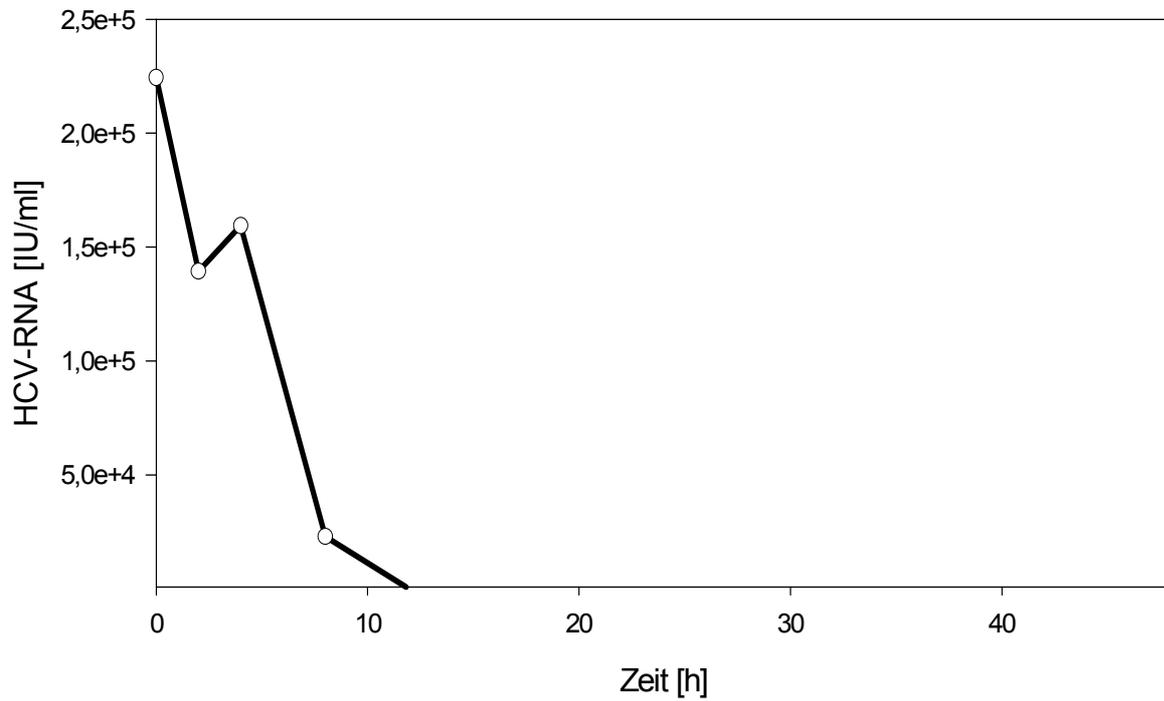


Abbildung 3b: Patient 10, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe B, lineare Darstellung

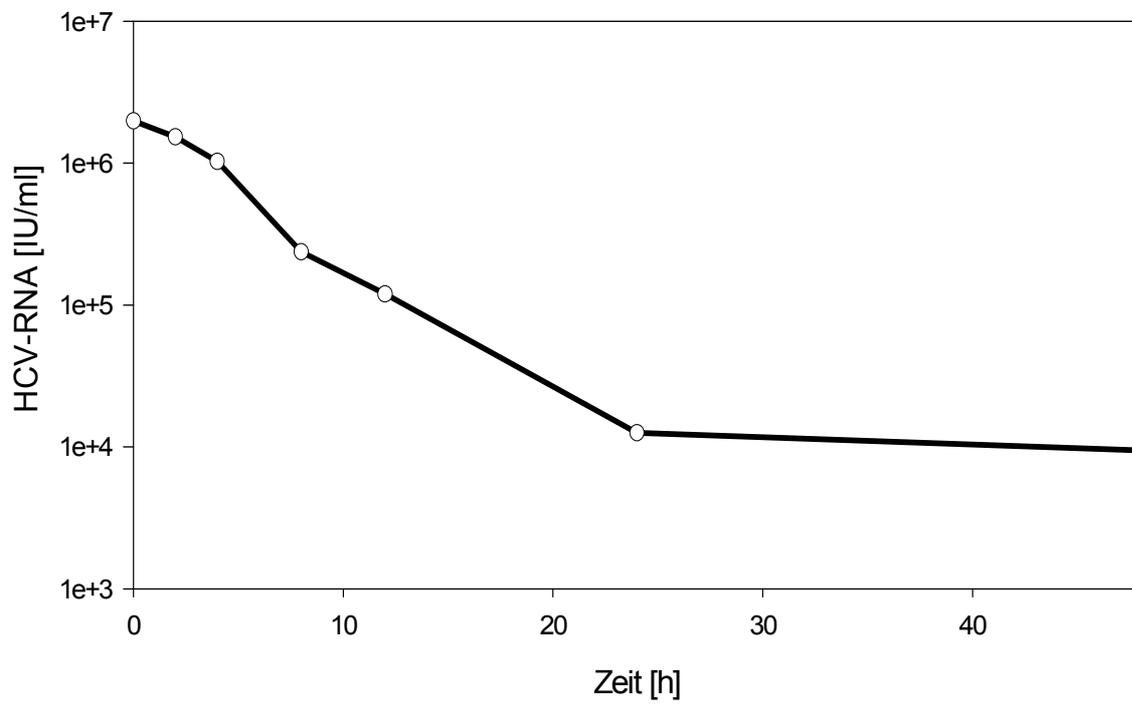


Abbildung 4: Patient 11, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

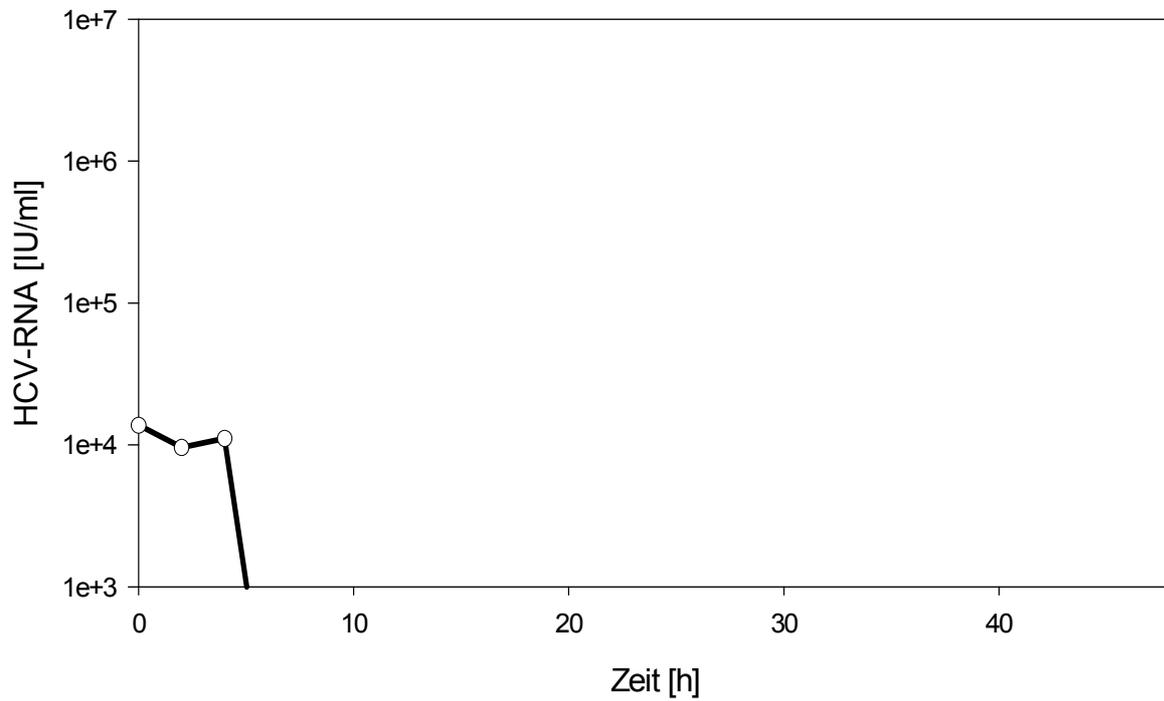


Abbildung 5: Patient 18, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

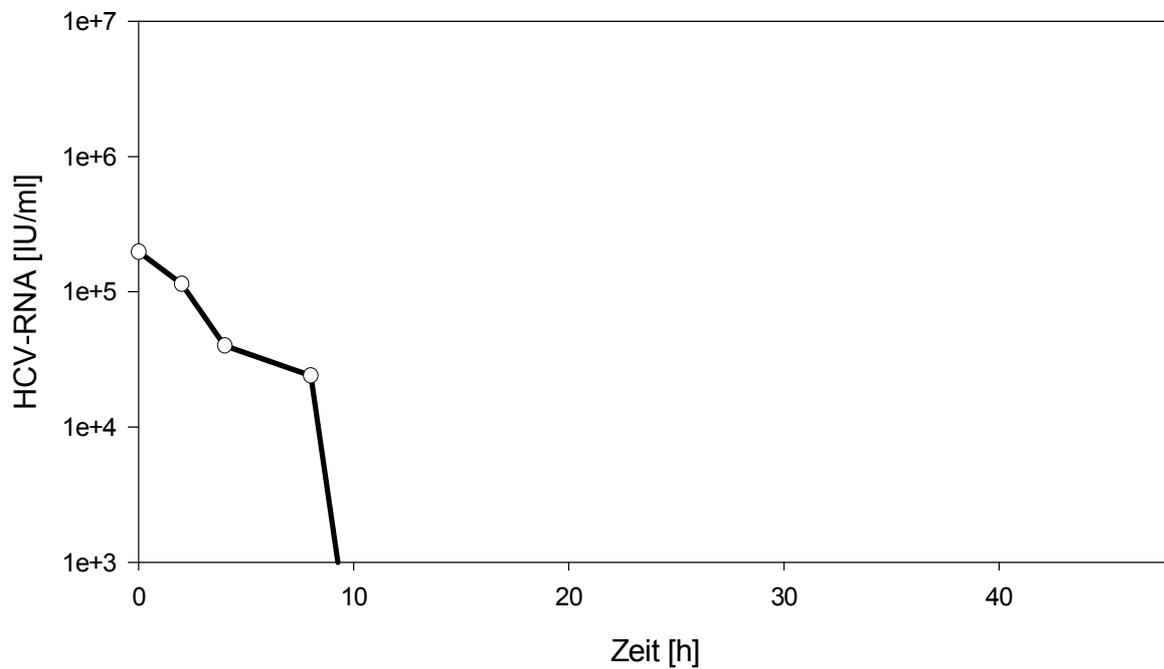


Abbildung 6: Patient 20, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

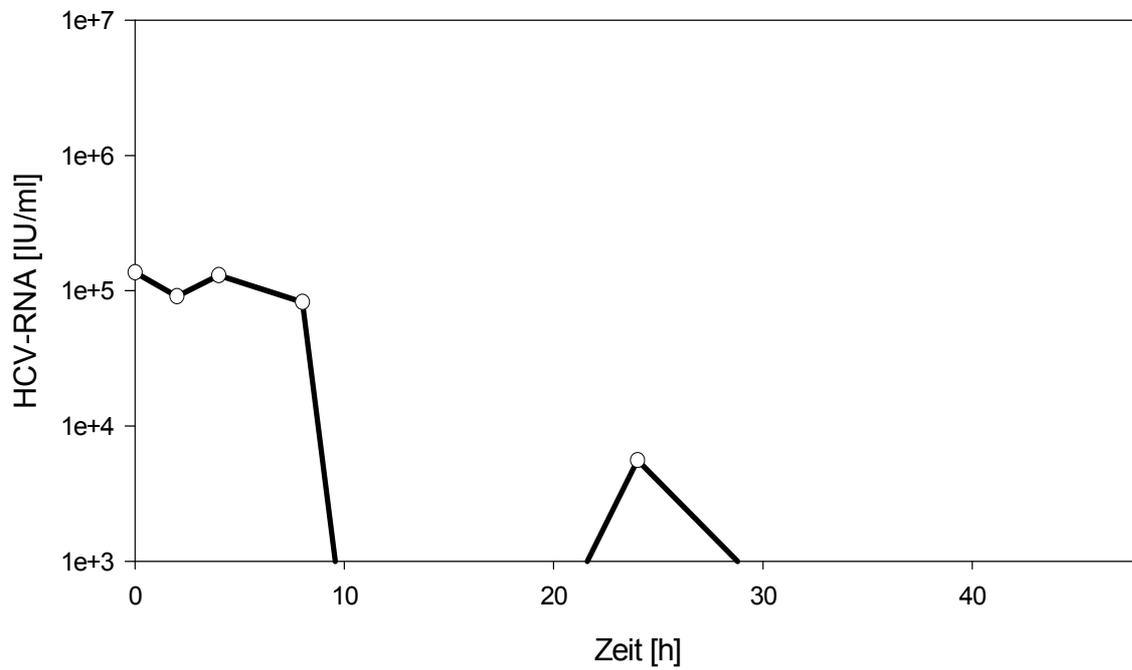


Abbildung 7a: Patient 30, weiblich, Genotyp 1b, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

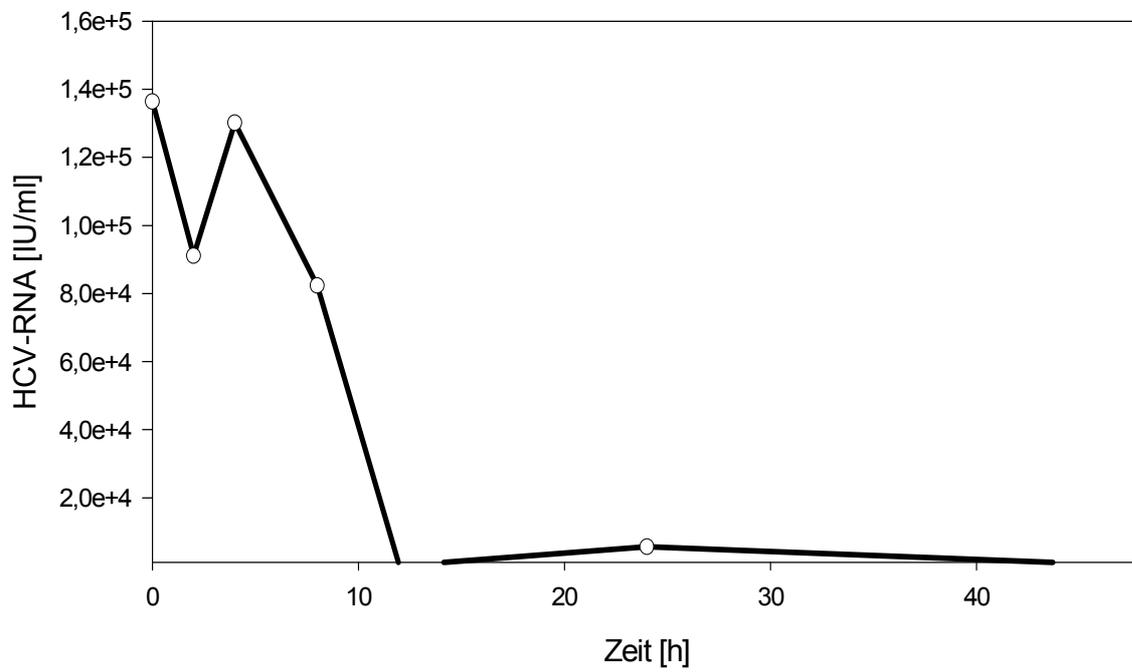


Abbildung 7b: Patient 30, lineare Darstellung

4.1.2. Delayed Responder

Die Delayed Responder stellen in unseren Untersuchungen die größte Gruppe dar (siehe Tabelle 2). Gemeinsam ist allen Delayed Respondern, daß sie unter Therapie einen vorübergehenden Anstieg der HCV-RNA-Konzentration über den Ausgangswert der Viruslast vor Therapiebeginn zeigten. Dieser Anstieg kann unmittelbar nach der Interferon-Applikation erfolgen, man spricht dann von einem 2h-Delayed-Response-Verhalten. Es kann aber auch zunächst zu einem kurzen Abfall der Viruslast und dann zu einem Anstieg über den Ausgangswert kommen. Nach der Definition von Thomas et al. spricht man dann, je nach Zeitpunkt des Wiederanstiegs, von einem 4h-, 8h- oder 12h-Delayed-Response-Verhalten.

Von den insgesamt fünfzehn Delayed Respondern zeigten vierzehn Patienten eine Elimination der HCV-RNA unter Therapie und eine Sustained-Response gemäß den Follow-up-Untersuchungen. Bei einem Patienten (Patient 3, männlich, Genotyp 1b) wurde in der Kontrolle fünf Monate nach Therapiebeginn ein Breakthrough nachgewiesen.

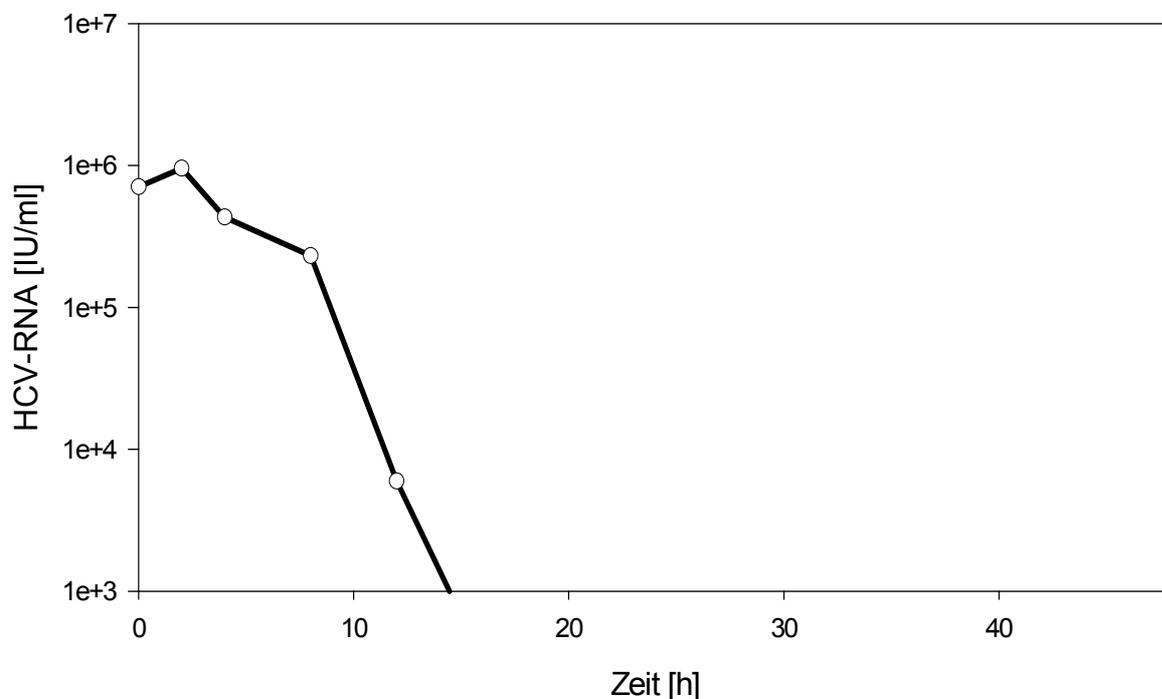


Abbildung 8: Patient 1, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

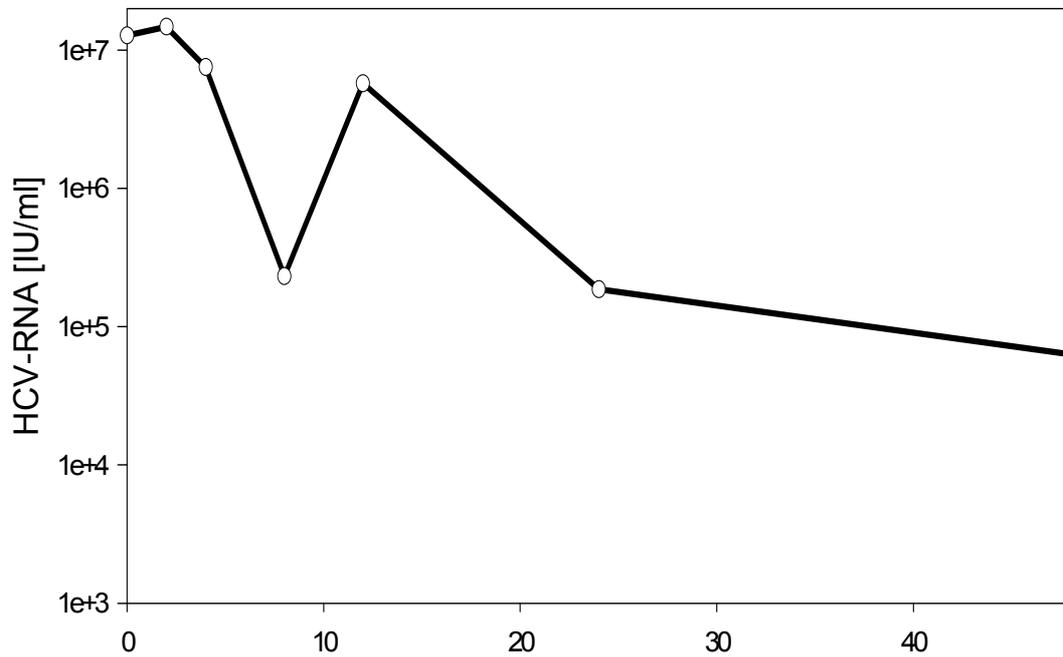


Abbildung 9a: Patient 2, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

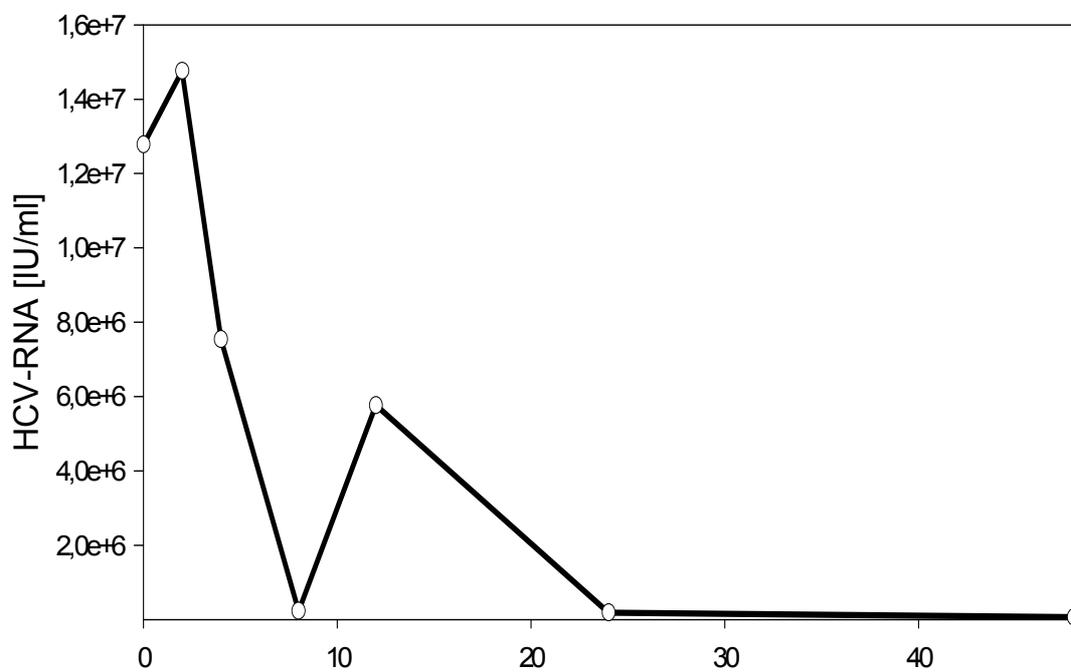


Abbildung 9b: Patient 2, lineare Darstellung

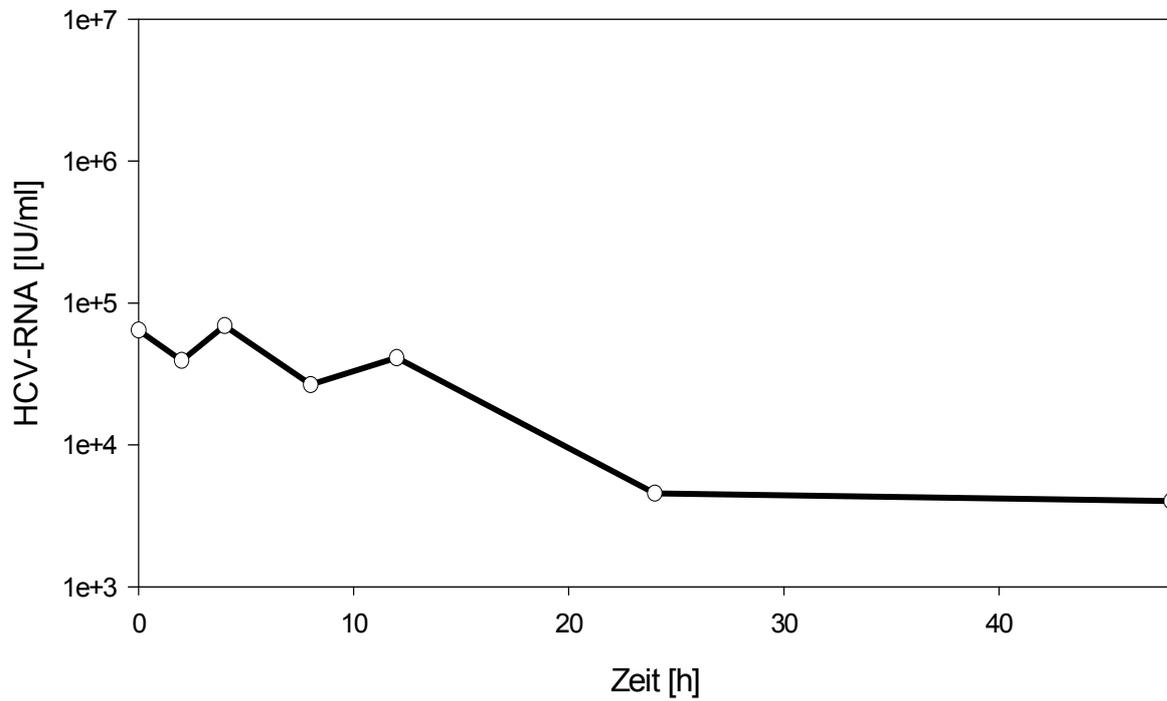


Abbildung 10: Patient 3, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

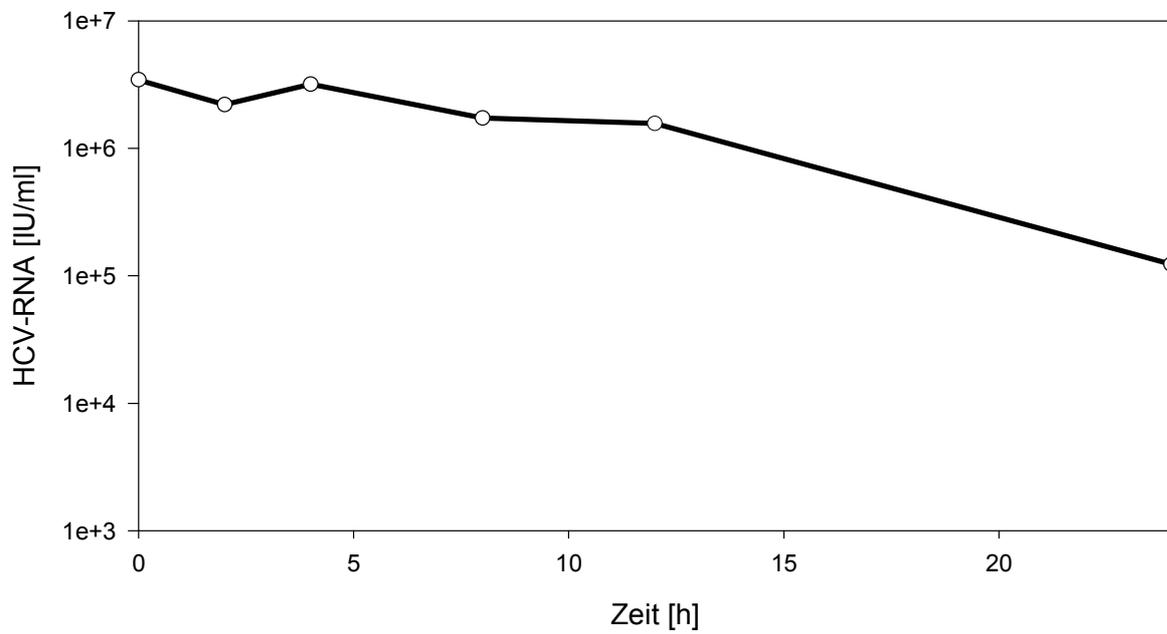


Abbildung 11a: Patient 4, weiblich, Genotyp 1b, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung (48h-Zeitpunkt fehlt)

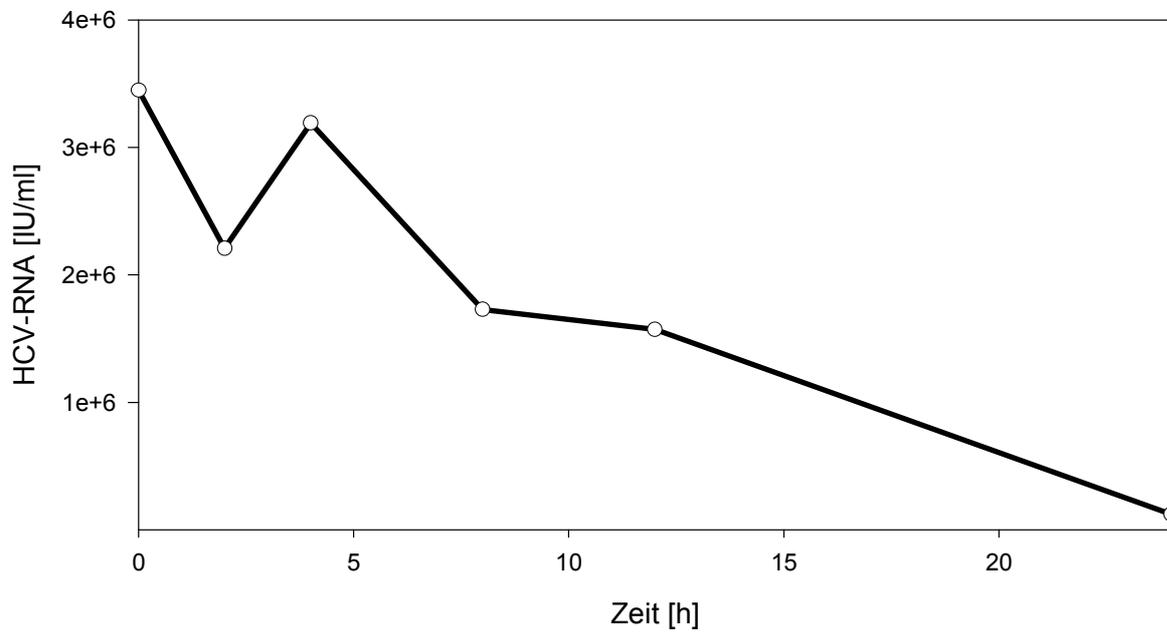


Abbildung 11b: Patient 4, lineare Darstellung

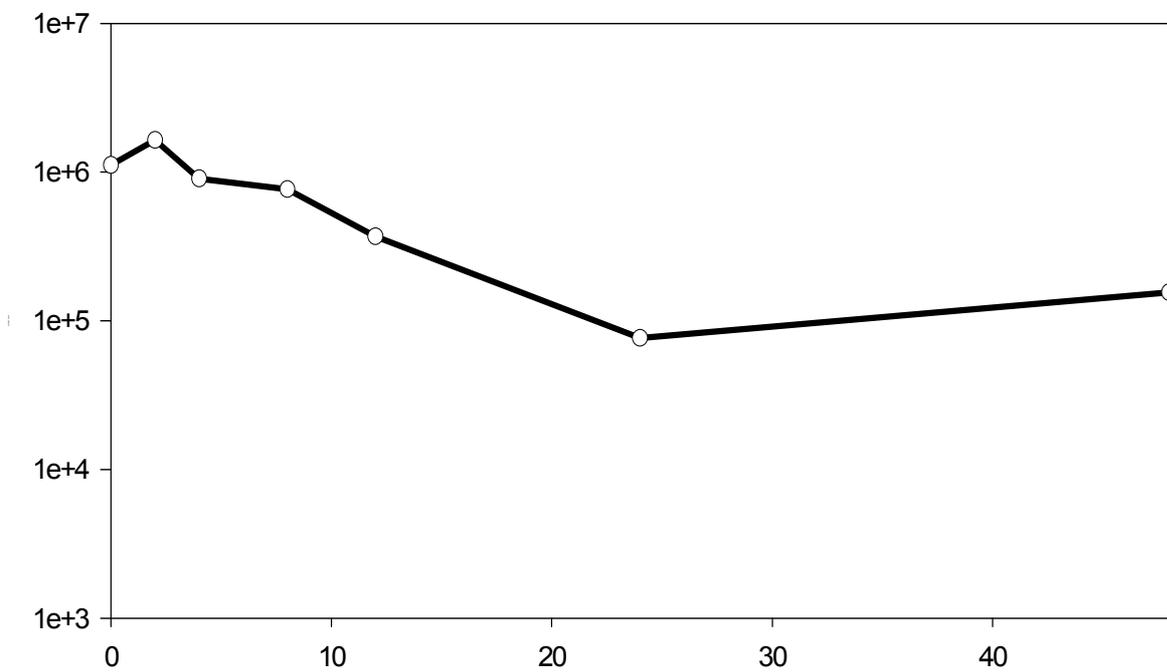


Abbildung 12a: Patient 7, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

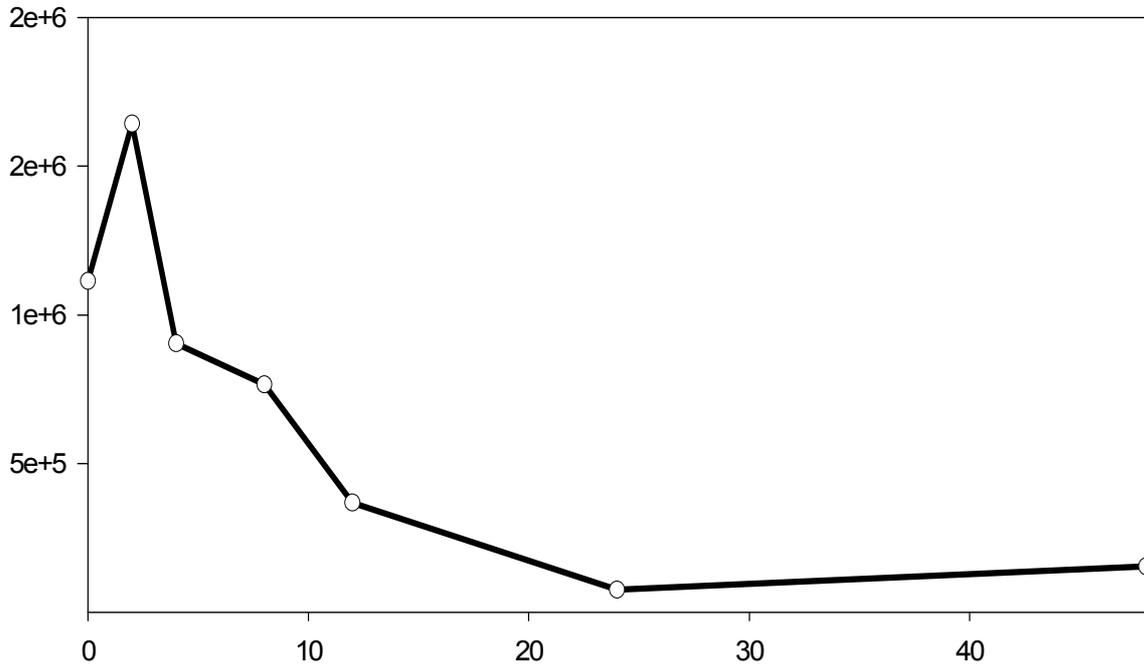


Abbildung 12b: Patient 7, lineare Darstellung

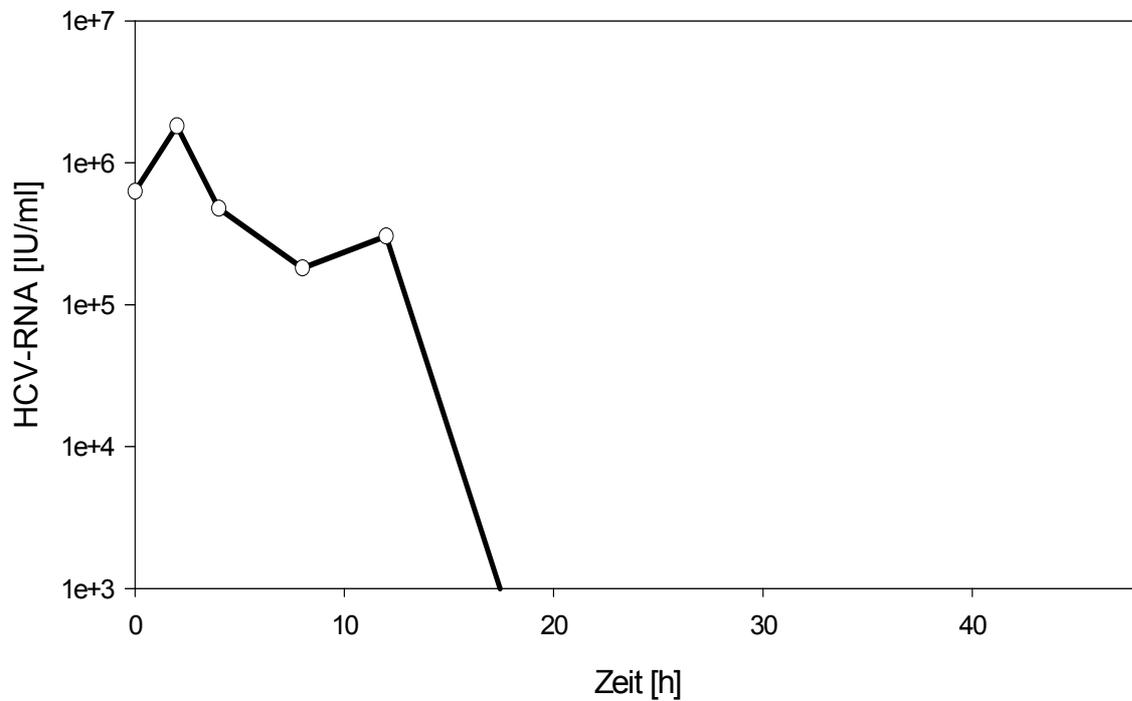


Abbildung 13: Patient 12, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

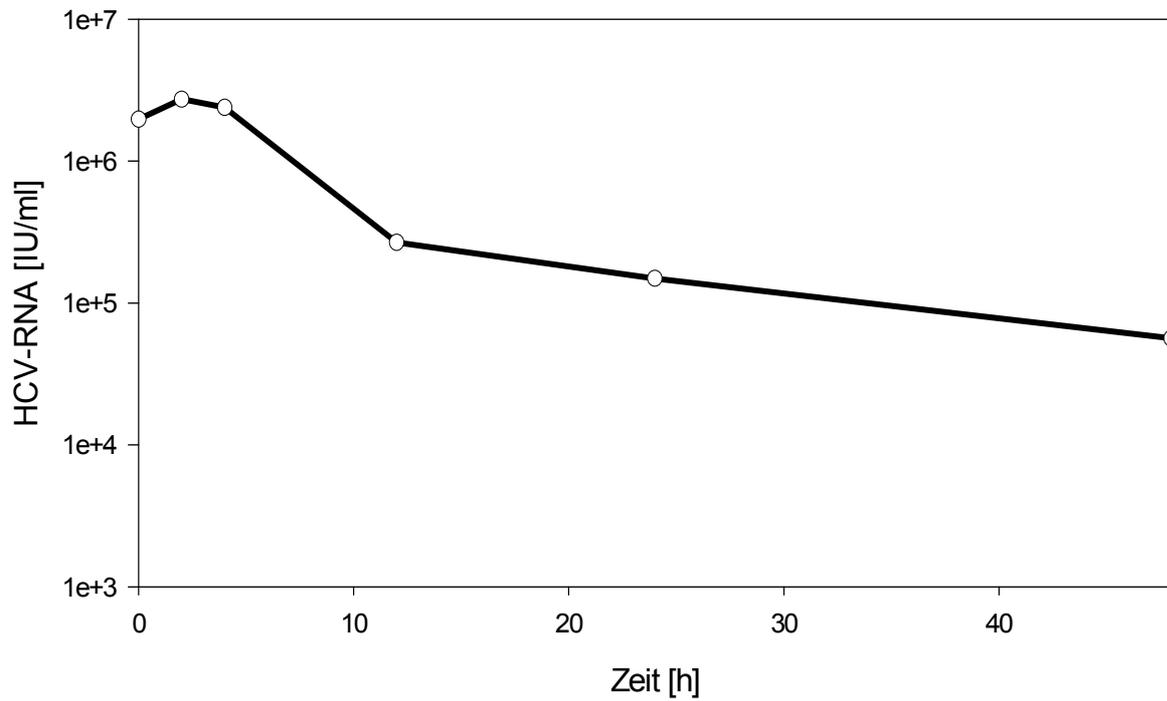


Abbildung 14a: Patient 13, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

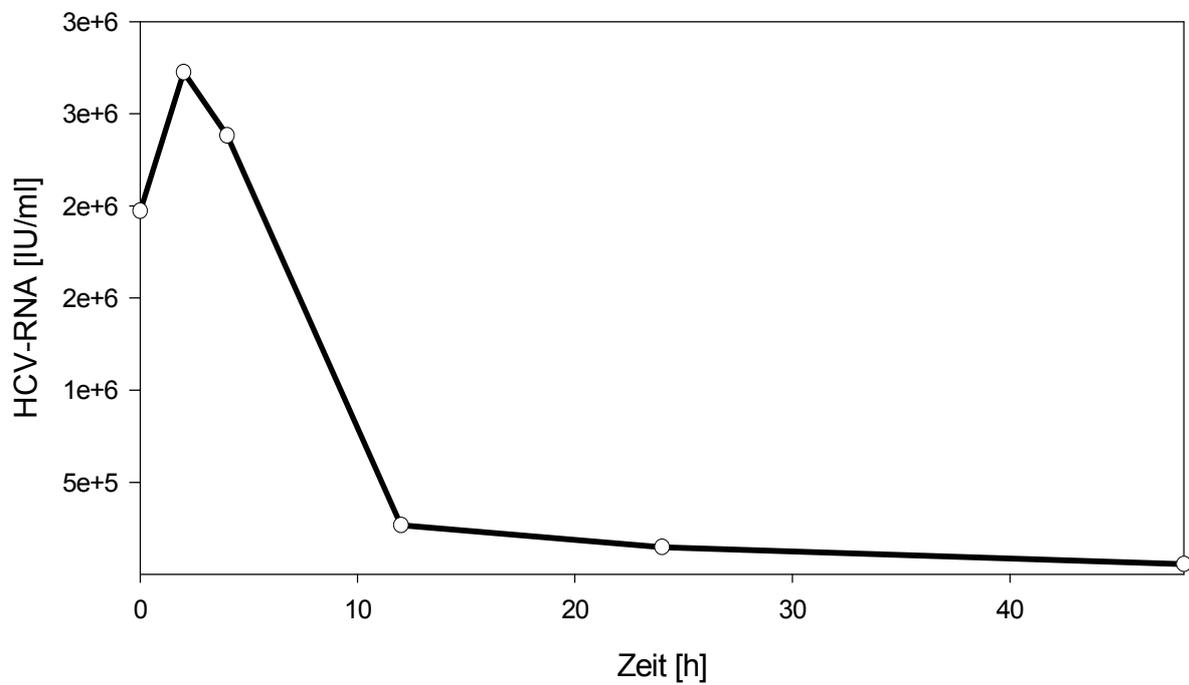


Abbildung 14b: Patient 13, lineare Darstellung

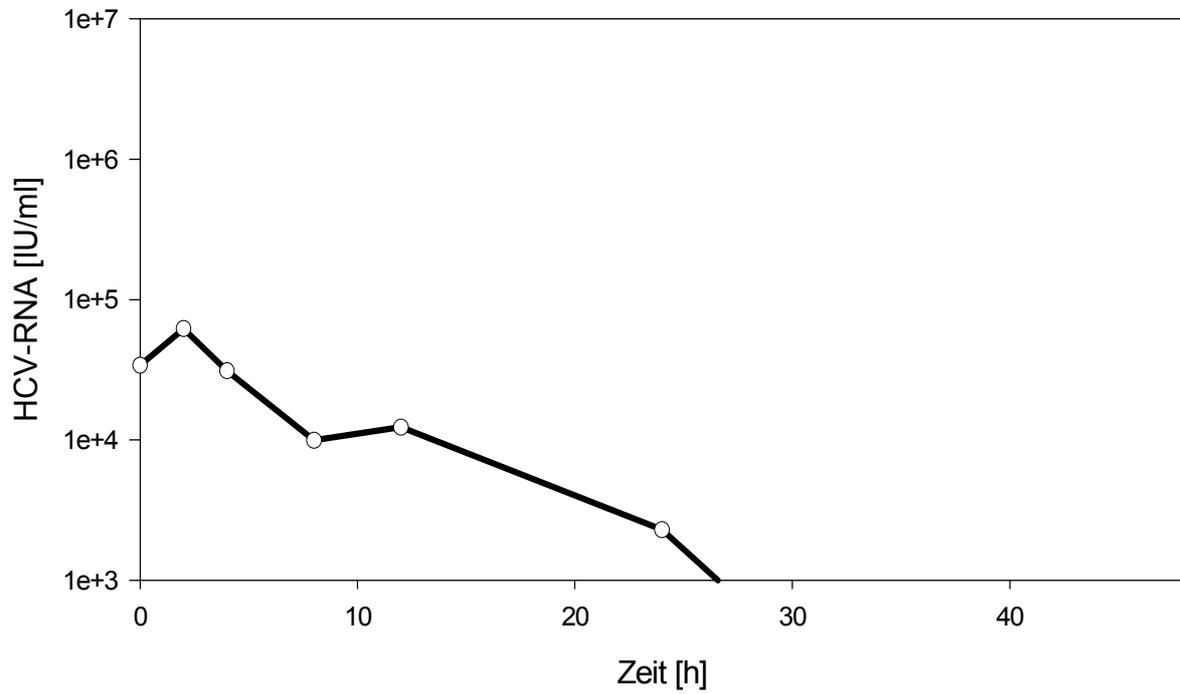


Abbildung 15: Patient 15, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

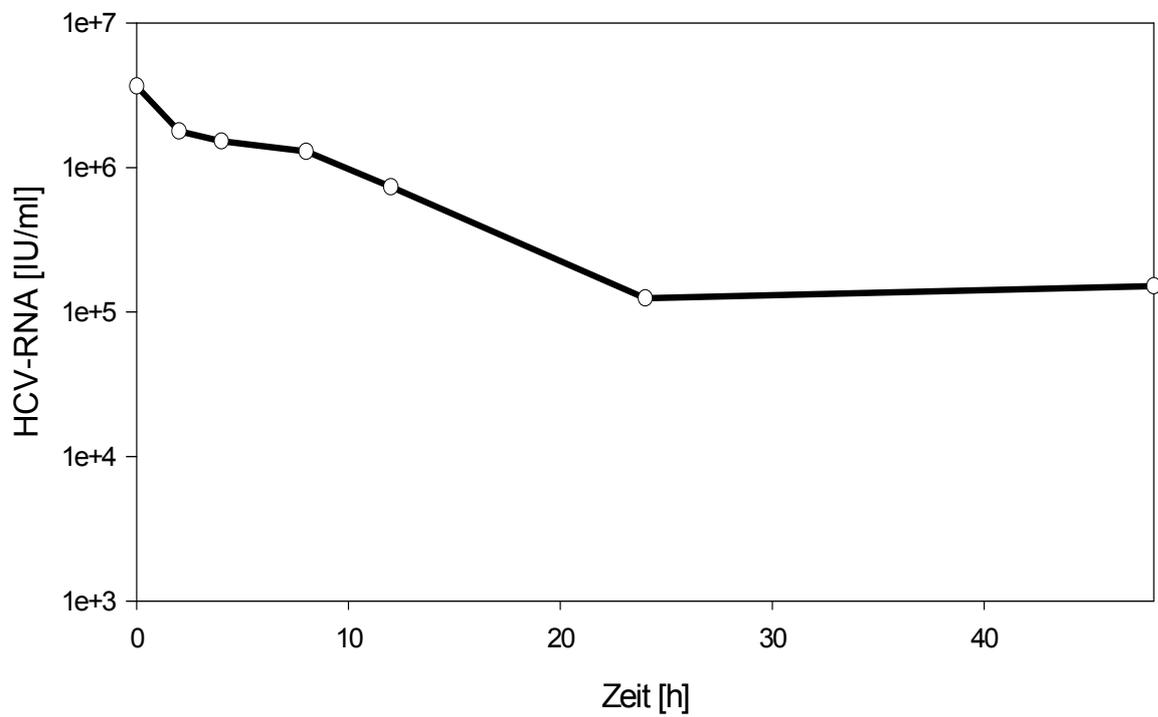


Abbildung 16a: Patient 16, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

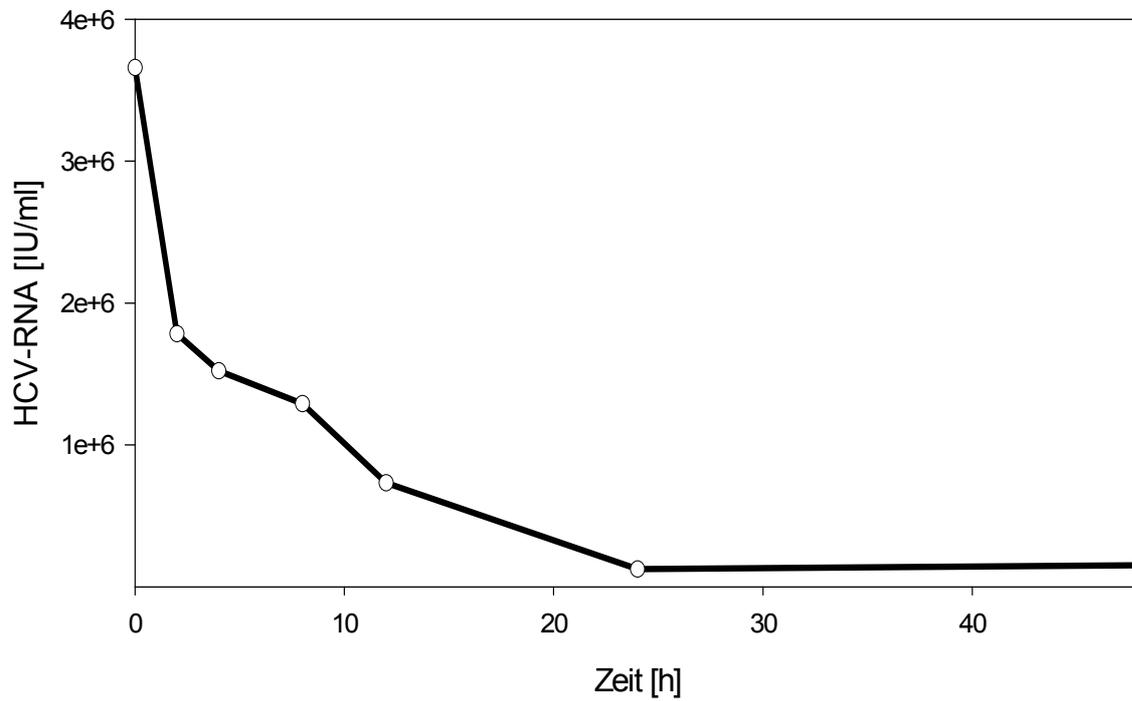


Abbildung 16b: Patient 16, lineare Darstellung

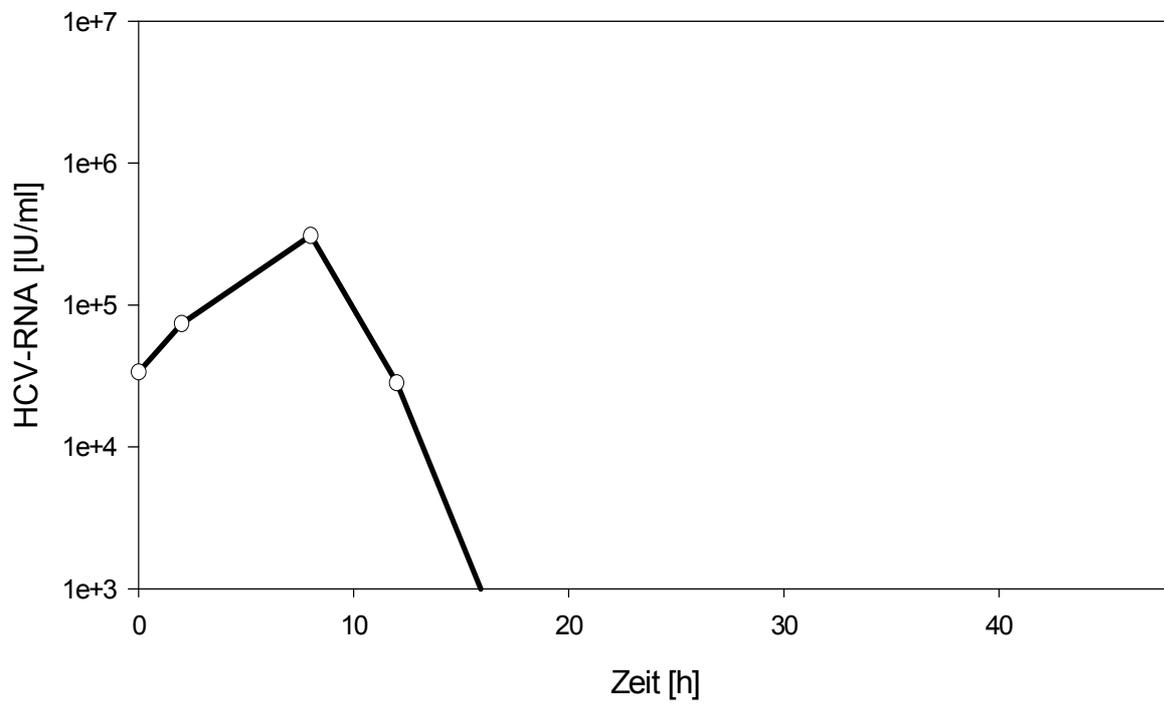


Abbildung 17: Patient 19, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

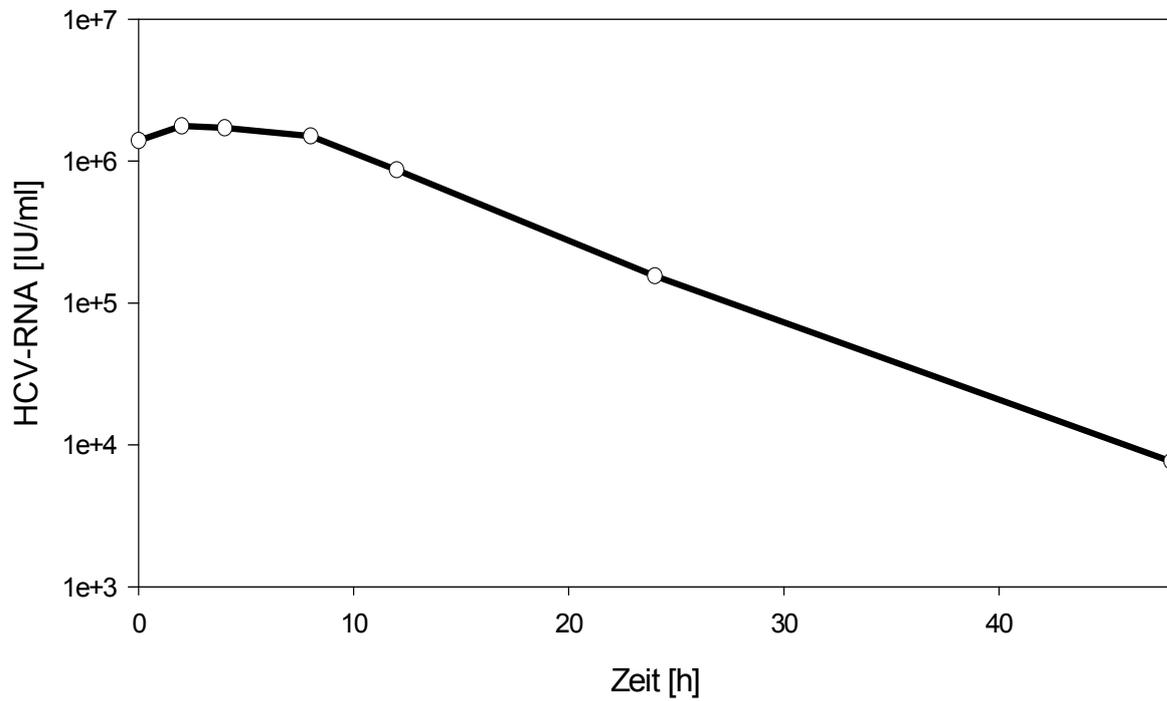


Abbildung 18a: Patient 21, weiblich, Genotyp 1a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

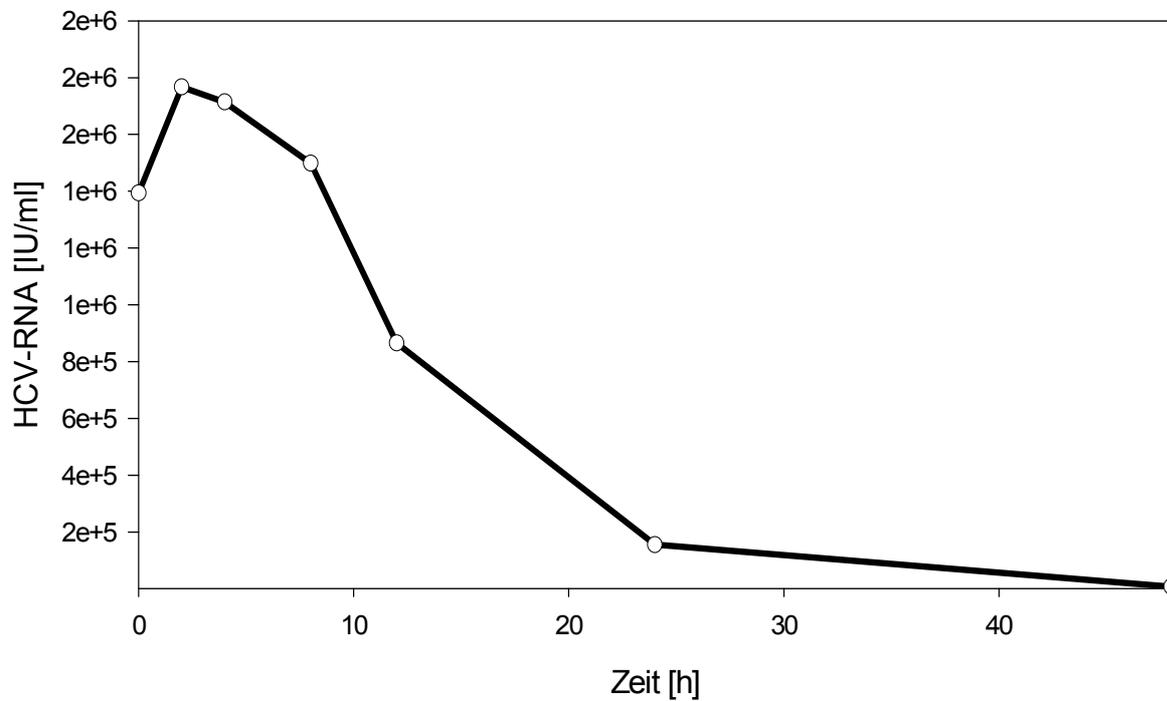


Abbildung 18b: Patient 21, lineare Darstellung

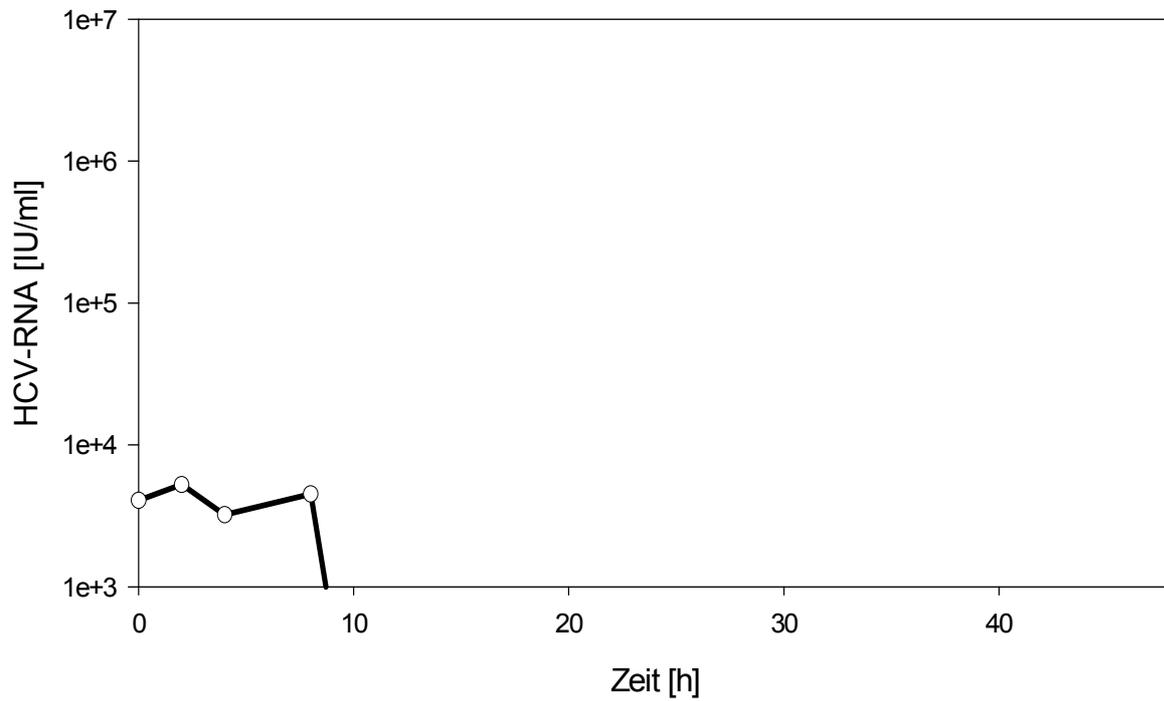


Abbildung 19a: Patient 24, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

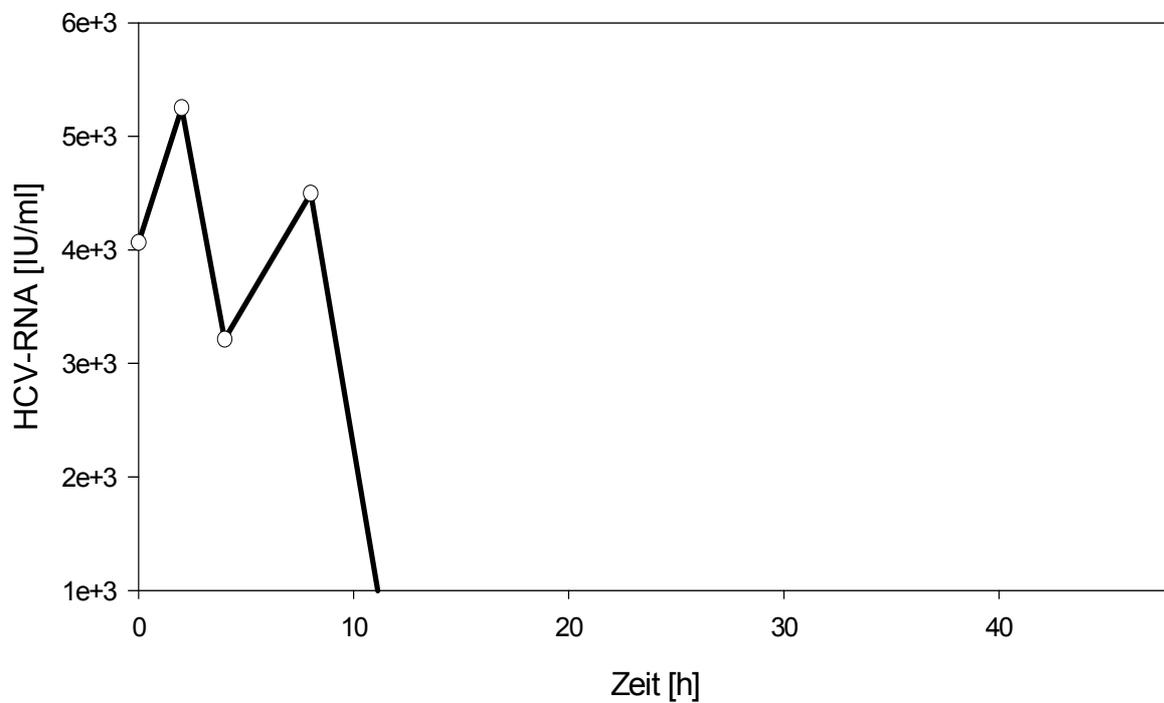


Abbildung 19b: Patient 24, lineare Darstellung

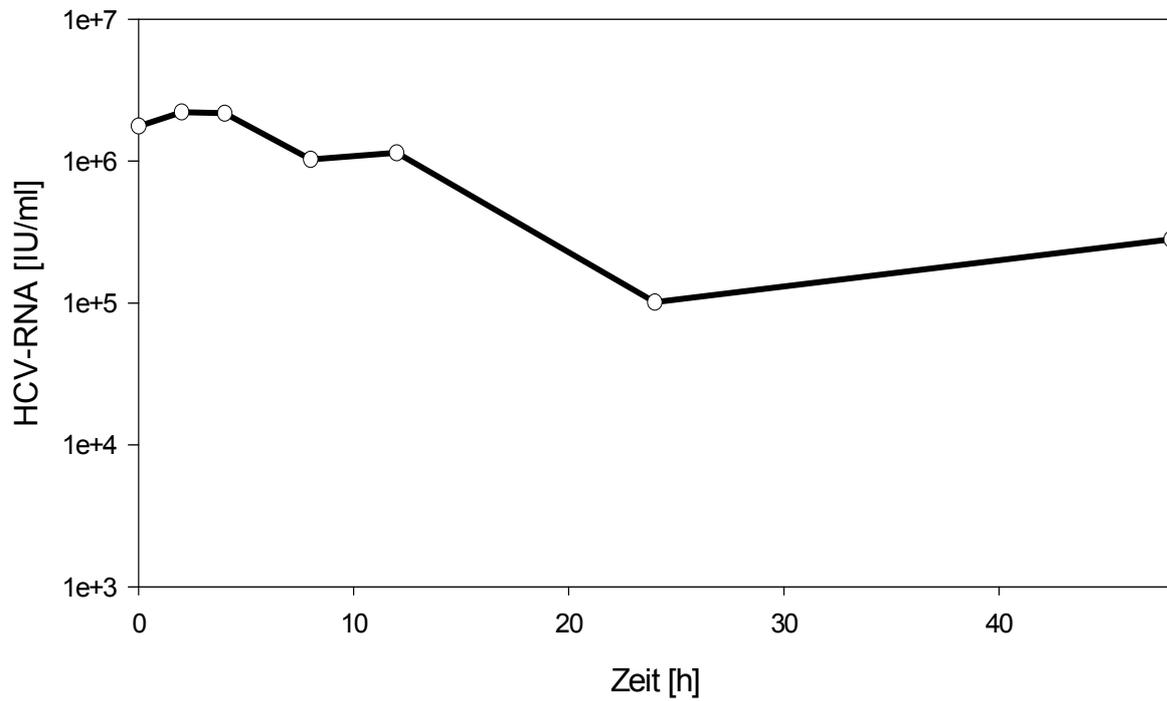


Abbildung 20a: Patient 26, weiblich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

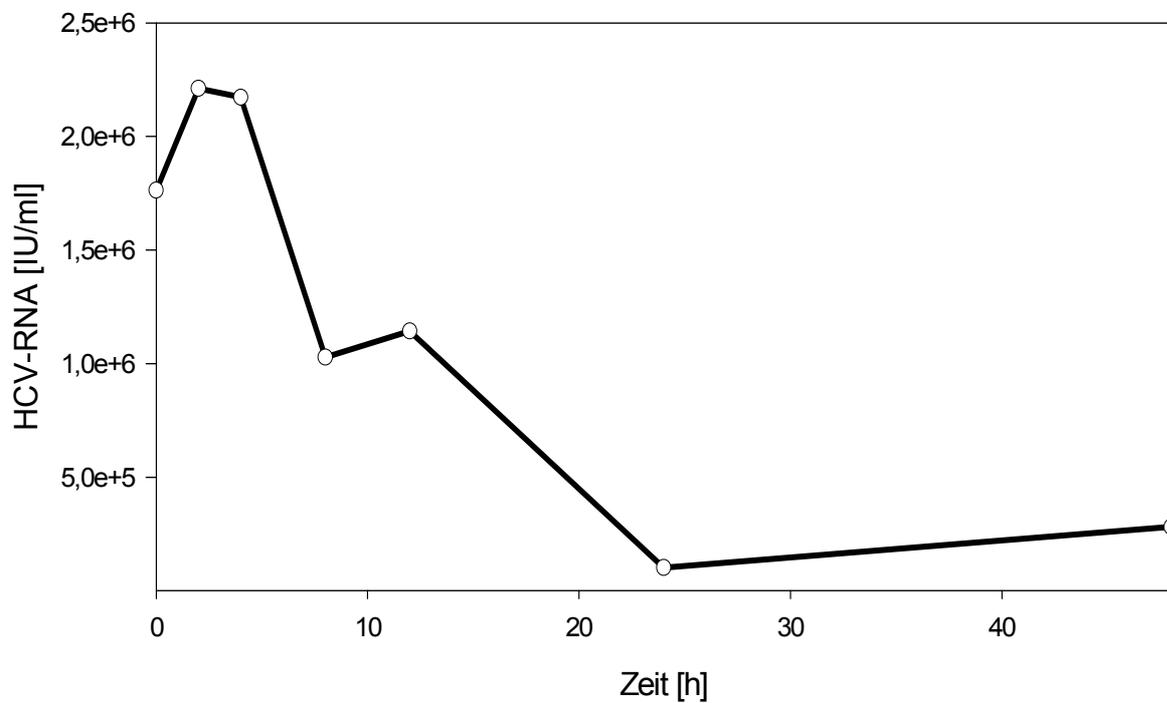


Abbildung 20b: Patient 26, lineare Darstellung

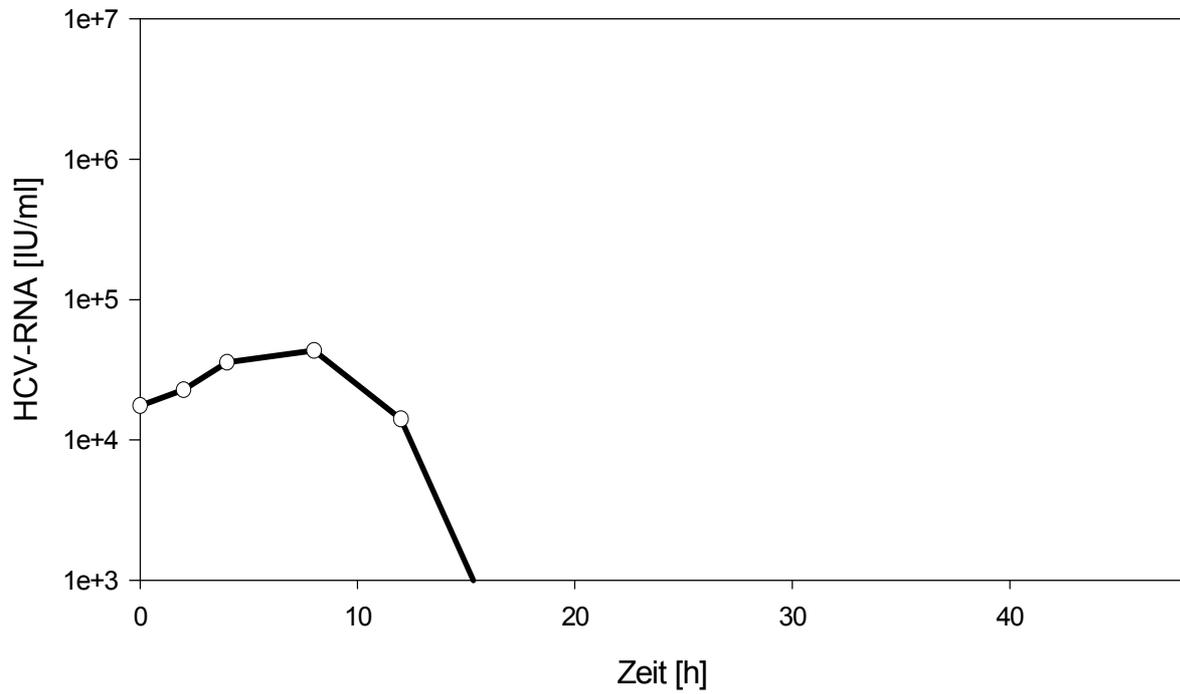


Abbildung 21: Patient 27, weiblich, Genotyp 1b, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

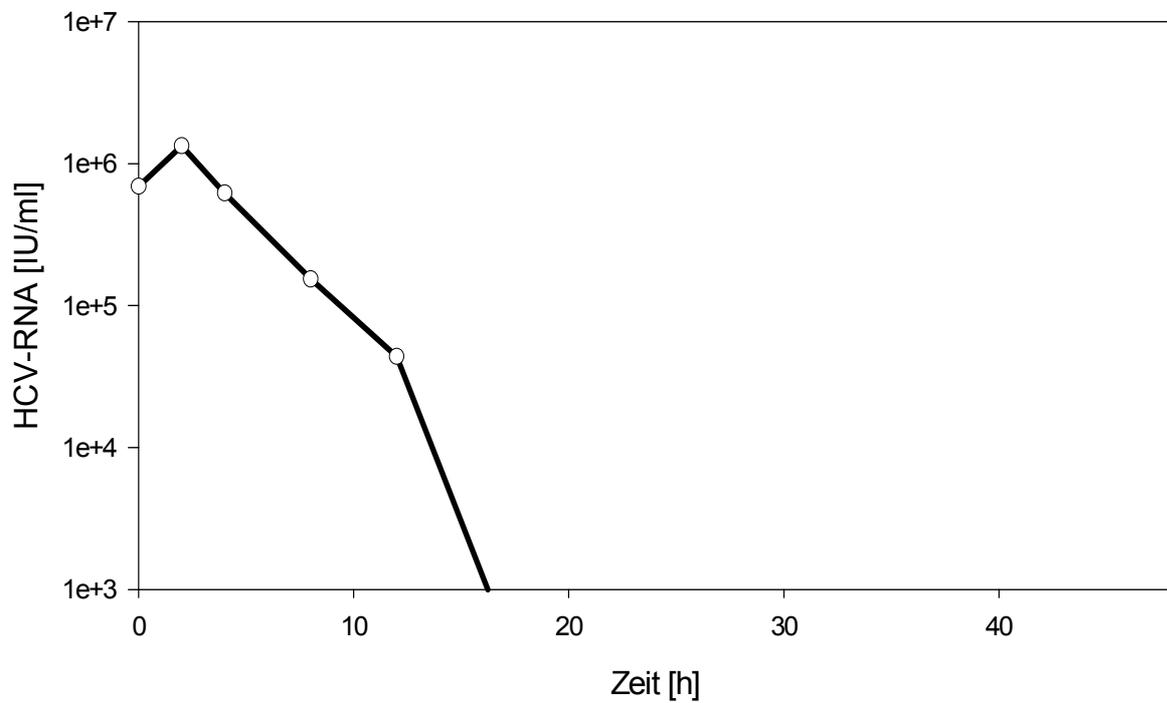


Abbildung 22: Patient 28, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

4.1.3. Non Responder

Im folgenden Abschnitt sind die HCV-RNA-Frühkinetiken der fünf Non-Responder dargestellt. Bei keinem dieser Patienten gelang eine Heilung, bei drei Patienten lag jedoch die HCV-RNA-Konzentration im Zeitraum von zwei bis vier Monaten nach Therapiebeginn für kurze Zeit unter der Nachweisgrenze. Allerdings stieg die Viruslast dann schnell wieder an und blieb danach stetig oberhalb der Nachweisgrenze. Zwei der fünf Non Responder zeigten sogar keinerlei Reaktion auf die Therapie und blieben konstant deutlich über der Nachweisgrenze.

In den unten dargestellten Frühkinetiken lässt sich bei keinem der fünf Patienten eine adäquate Reaktion auf die Gabe von Interferon nachweisen.

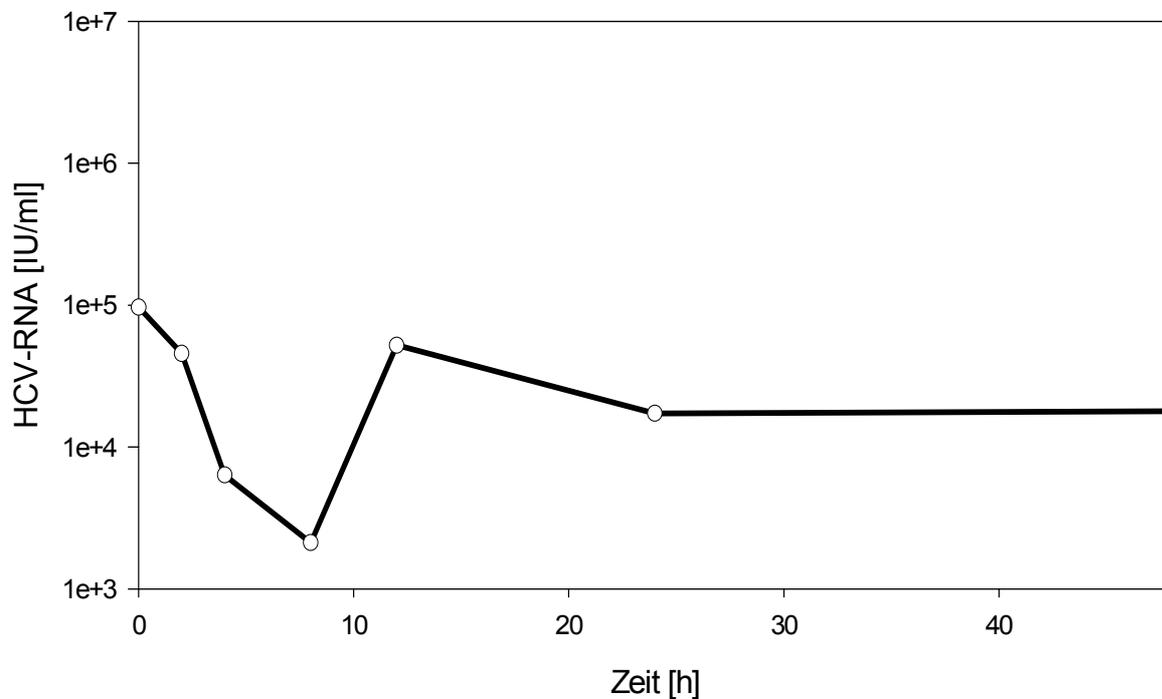


Abbildung 23a: Patient 6, weiblich, Genotyp 1a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

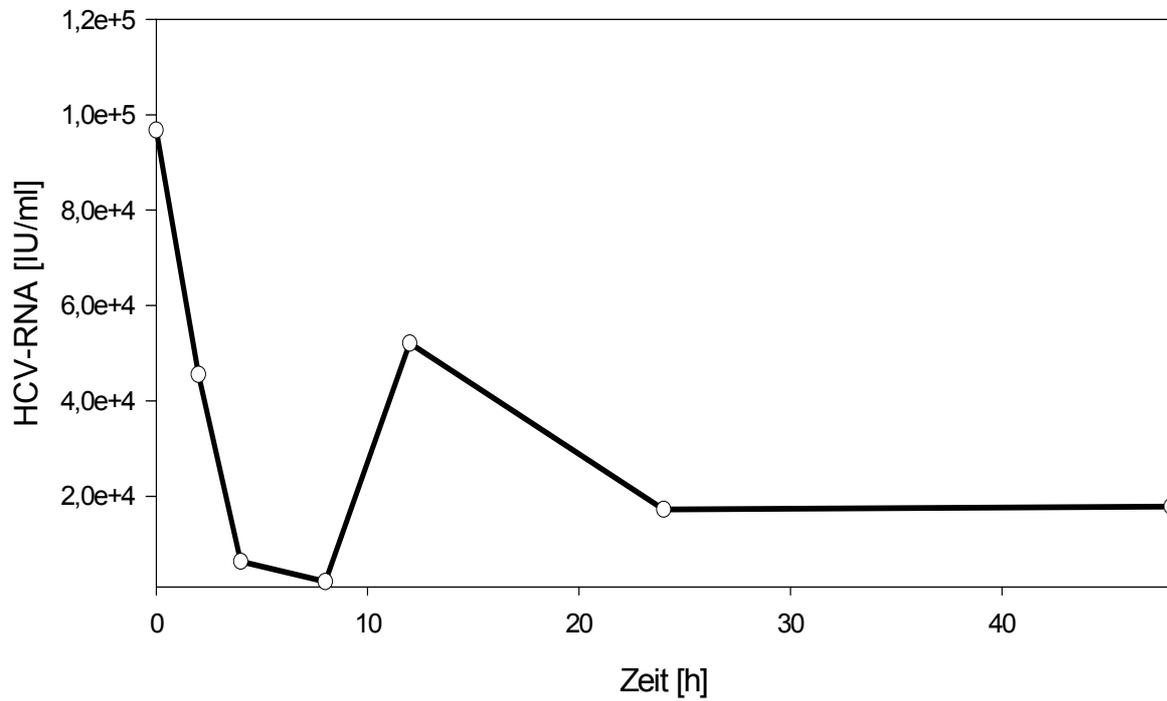


Abbildung 23b: Patient 6, lineare Darstellung

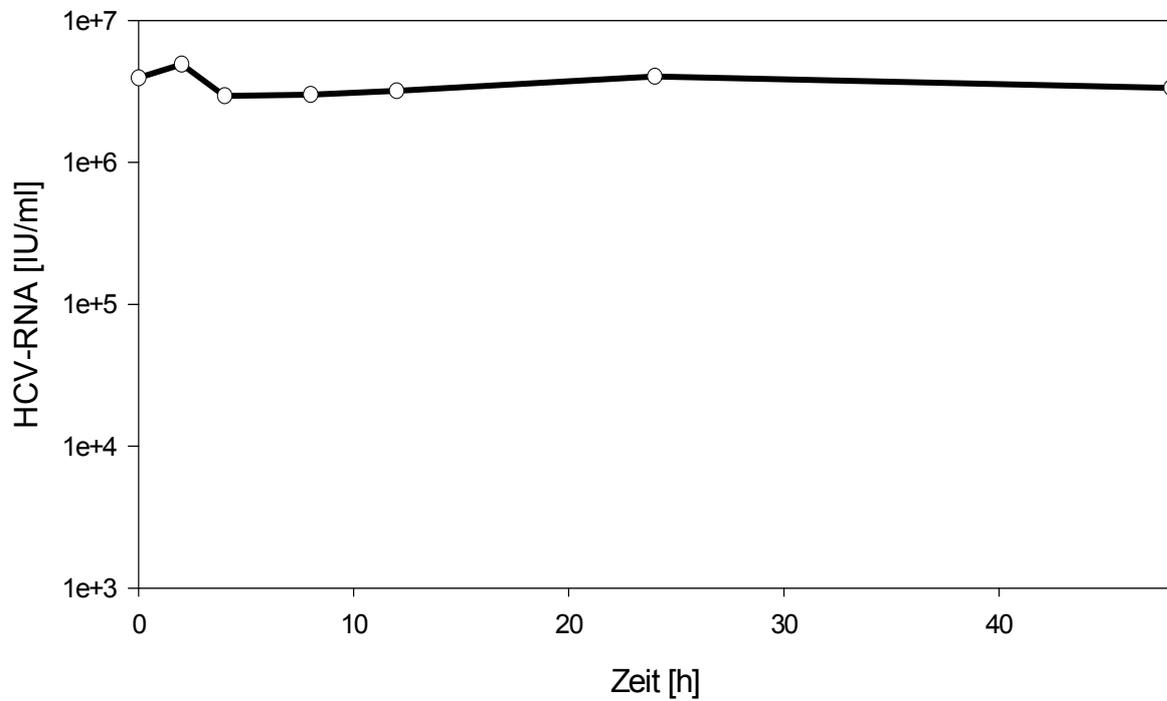


Abbildung 24: Patient 9, weiblich, Genotyp 1a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

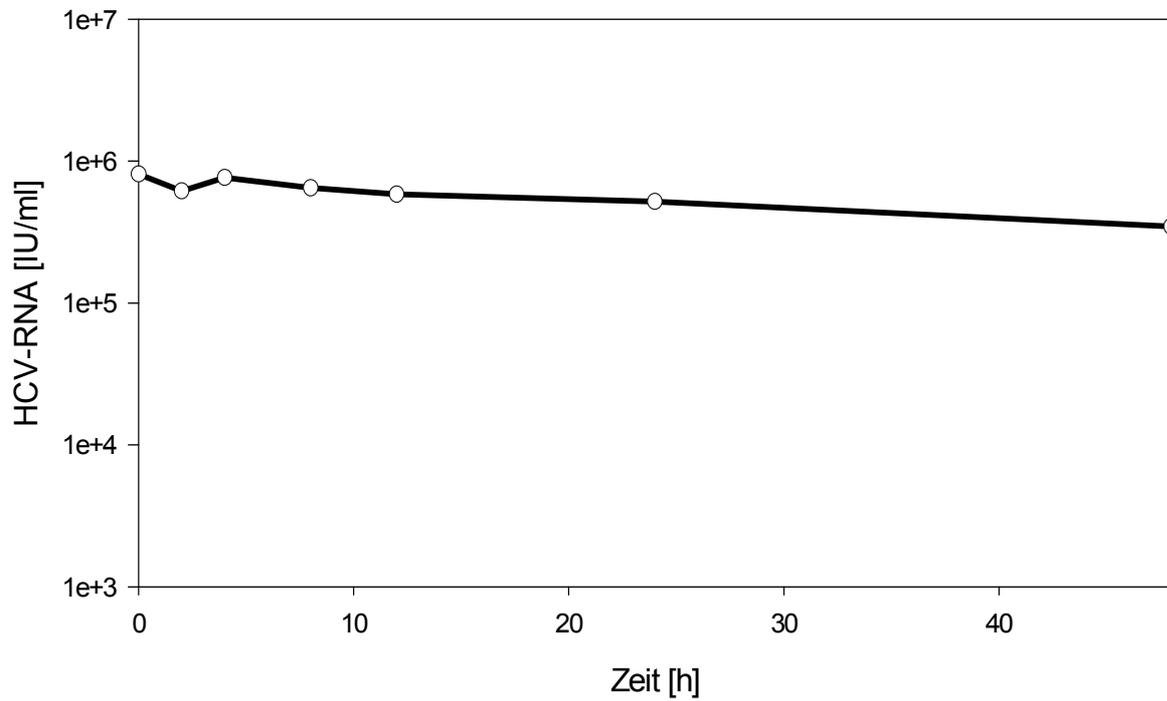


Abbildung 25: Patient 14, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

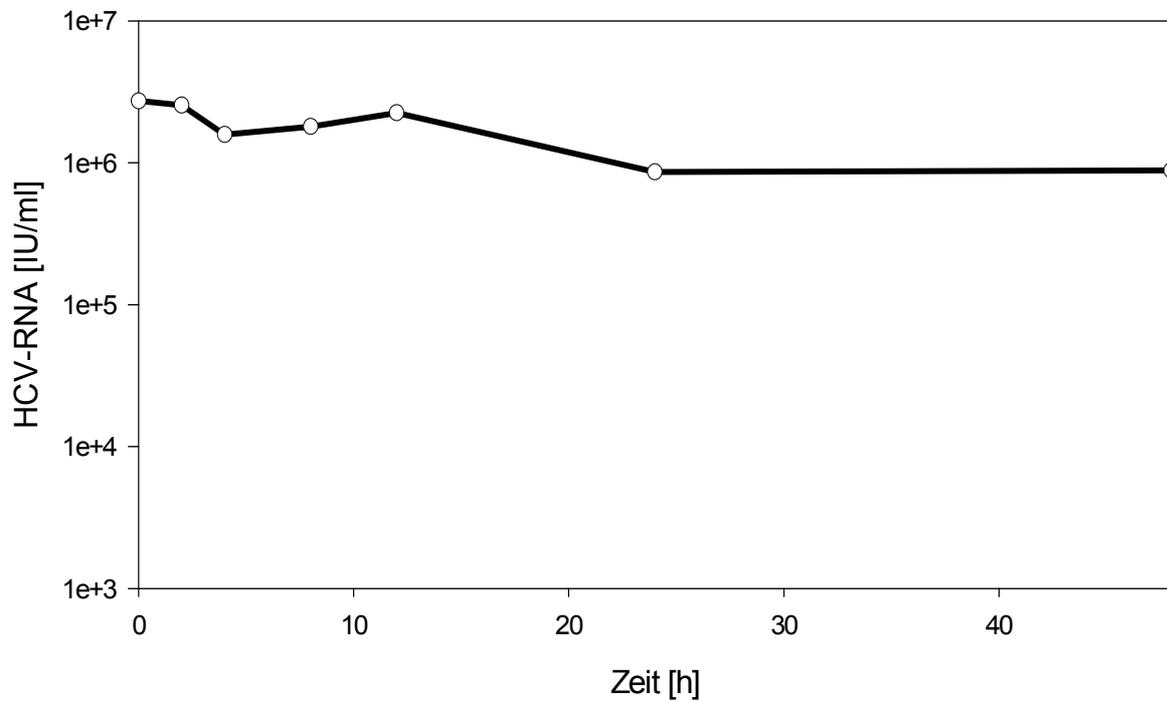


Abbildung 26: Patient 22, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, halblogarithmische Darstellung

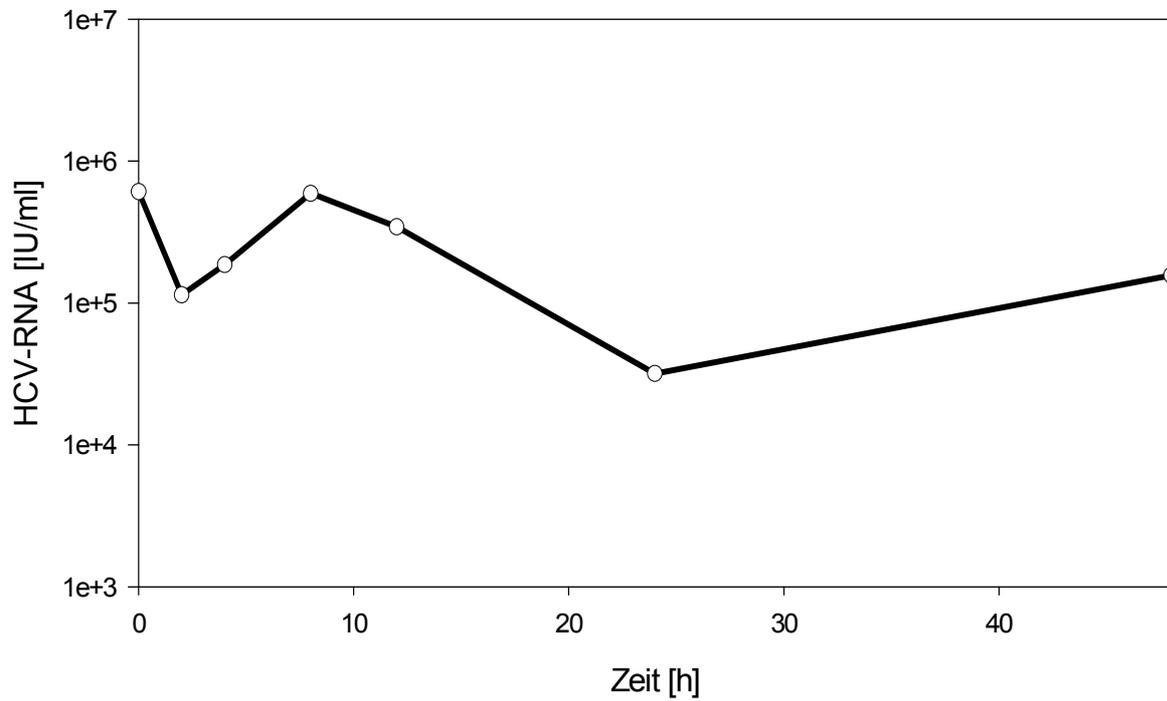


Abbildung 27: Patient 25, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

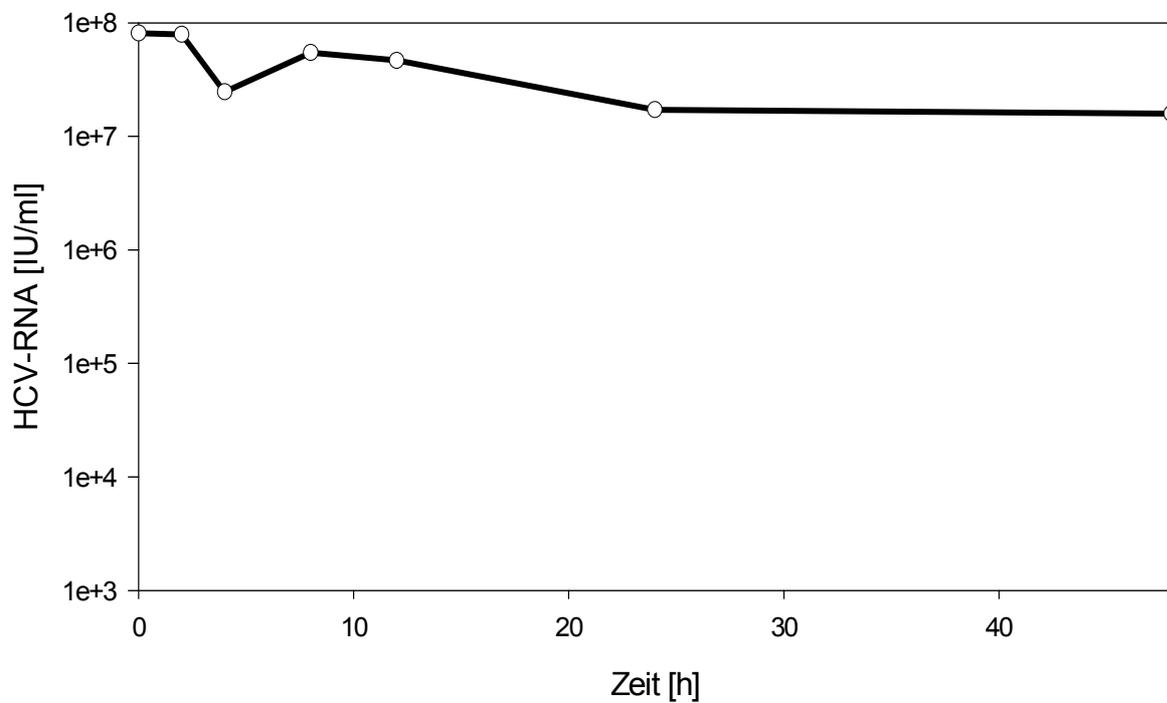


Abbildung 28: Patient 29, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe A, halblogarithmische Darstellung

4.1.4. Reaktionstypen der HCV-RNA-Frühkinetik mit und ohne Roferon

Beim Vergleich der Patienten, die zusätzlich zur Peg-IFN- α /Ribavirin-Kombinationstherapie initial IFN- α ein Mal erhielten, also Patienten der Therapiegruppe B, mit den Patienten ohne initiale Gabe von IFN- α (Therapiegruppe A) ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich des Response-Musters. So fanden wir in der Therapiegruppe B überwiegend Initial Responder, während in Therapiegruppe A das Delayed Response-Verhalten überwog (siehe Tab.3 bis Tab.5). Weiterhin zeigte sich, daß Non-Responder in der Therapiegruppe A signifikant häufiger zu finden sind (Tabelle 3; $p < 0,05$).

In der folgenden Graphik ist der arithmetische Mittelwert der auf die Ausgangswerte als 100 % normierten HCV-RNA-Konzentration aller Patienten der Therapiegruppe A der HCV-RNA-Konzentration der Therapiegruppe B gegenübergestellt:

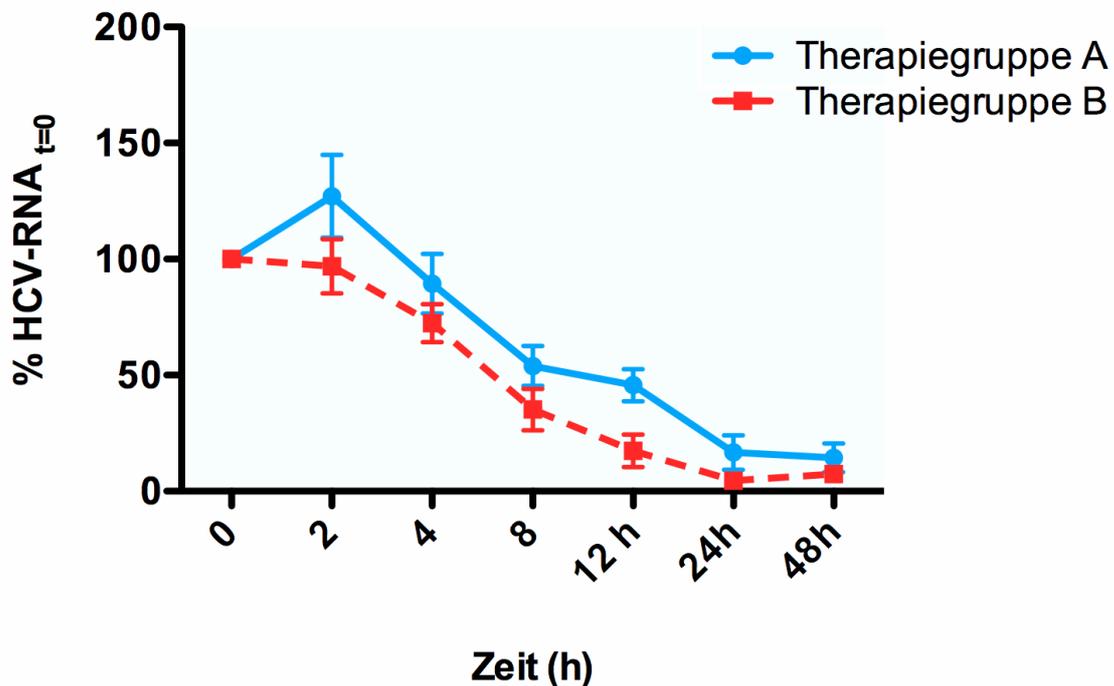


Abbildung 29: Mittlere HCV-RNA-Konzentration aller Patienten der Therapiegruppe A bzw. B in den ersten 48 h. (Therapiegruppe A: $n=15$, Therapiegruppe B: $n=13$)

Hierbei fällt auf, daß in der Therapiegruppe A ein Anstieg der Viruslast nach zwei Stunden vorliegt, der in der Therapiegruppe B fehlt. Hierbei wurde jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung in Therapiegruppe A kein statistisches Signifikanzniveau erreicht. Im Folgenden zeigen beide Kurven einen annähernd identischen Verlauf, jedoch liegen die Werte bei Gruppe B wegen des fehlenden Anfangsanstiegs immer etwas niedriger.

Vergleicht man nun weiterhin die unten folgenden Kinetiken, die nach Response-Verhalten und Therapiegruppe getrennt sind, so zeigt sich beim Vergleich der Initial Responder, daß der Abfall der Viruskonzentration in Therapiegruppe A wesentlich schwächer und langsamer ausfällt..

Wodurch diese Unterschiede im Response-Verhalten bedingt sind, galt es in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

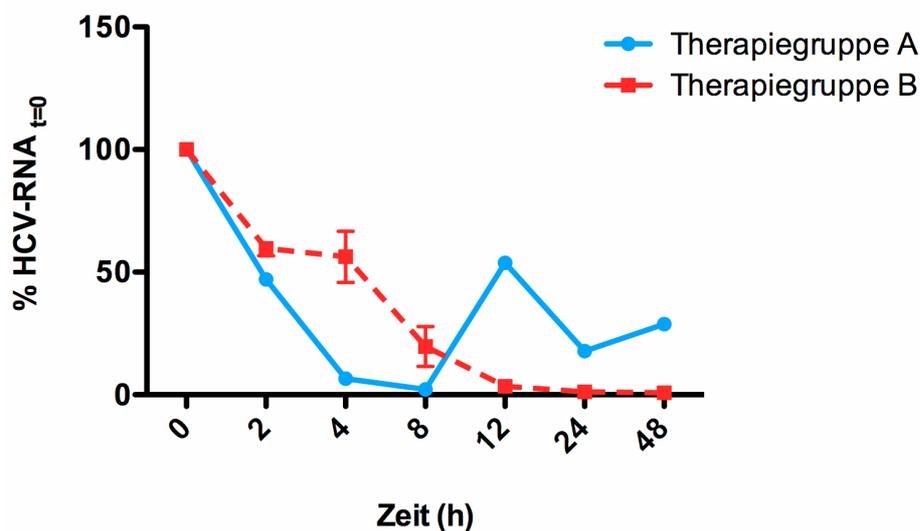


Abbildung 30: Mittlere HCV-RNA-Konzentration aller Initial Responder. (Therapiegruppe A: n=1; Therapiegruppe B: n=6; * p<0.05)

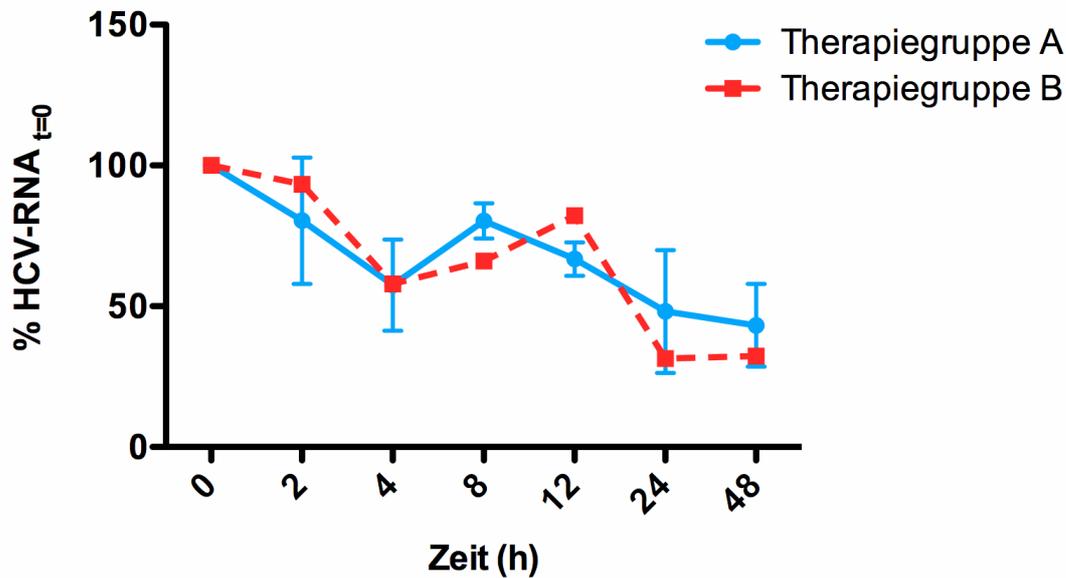


Abbildung 31: Mittlere HCV-RNA-Konzentration aller Non Responder. (Therapiegruppe A: n=5; Therapiegruppe B: n=1)

4.2. HCV-Core Antigen

Bereits in der ersten HCV-Studie unseres Instituts wurde neben der HCV-RNA auch das Verhalten des HCV-Core-Antigens bestimmt sowie der Quotient aus HCV-RNA und HCV-Core-Antigen für den Zeitraum der ersten 48 Stunden nach Interferon-Therapiebeginn berechnet. Dabei zeigte sich, daß die Kurven beider Parameter nicht, wie zunächst vermutet, einen parallelen Verlauf aufweisen, sondern der Quotient aus HCV-RNA/HCV-Core-Ag im zeitlichen Verlauf signifikanten Schwankungen unterliegt.

Wir untersuchten insgesamt 406 Proben mit dem in Kapitel 2.2.5 erläuterten Architect® HCV-Ag-Assay der Firma Abbott und verglichen die Kinetik des HCV-Core-Ag mit der der HCV-RNA in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn. Laut Angaben des Herstellers sind alle Proben mit einer Konzentration > 3 fmol/l als HCV-Ag positiv zu werten. Die insgesamt 137 negativen HCV-Core-Ag Proben waren auch in der HCV-PCR negativ. Ein völlig anderes Bild zeigte sich jedoch beim Vergleich der HCV-RNA negativen Proben. Hier waren 52 Proben, die in der HCV-RNA-PCR unter der Nachweisgrenze lagen, im HCV-Core-Ag-Assay positiv. Es handelte sich hierbei

ausschließlich um Proben von Initial Respondern und Delayed Respondern zum Zeitpunkt 8, 12, 24 oder 48 Stunden und in einigen Fällen auch noch ein oder zwei Wochen nach Therapiebeginn, als die HCV-RNA bereits unter die Nachweisgrenze gefallen war, während das Core-Antigen teilweise noch deutlich positiv war. Es ergab sich eine Schwankungsbreite von 3,4 fmol/l bis 16165,6 fmol/l, wobei ein Großteil der Proben Core-Ag-Werte zwischen 15 fmol/l bis 200 fmol/l zeigte. In allen Fällen dieser Core-Persistenz fiel jedoch das Core-Protein ebenfalls unter die Nachweisgrenze, mit Ausnahme des Patienten Nr. 3, der ein Delayed-Response-Verhalten zeigte und bei dem es im weiteren Verlauf nach fünf Monaten zu einem Breakthrough kam. Dieser Patient aus Gruppe A fiel vier Wochen nach Therapiebeginn unter die Nachweisgrenze der HCV-RNA-PCR und blieb in den Kontrollen vier monatelang HCV-RNA-negativ bis es zum Breakthrough kam. Das Core-Antigen hingegen lag über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich im positiven Bereich.

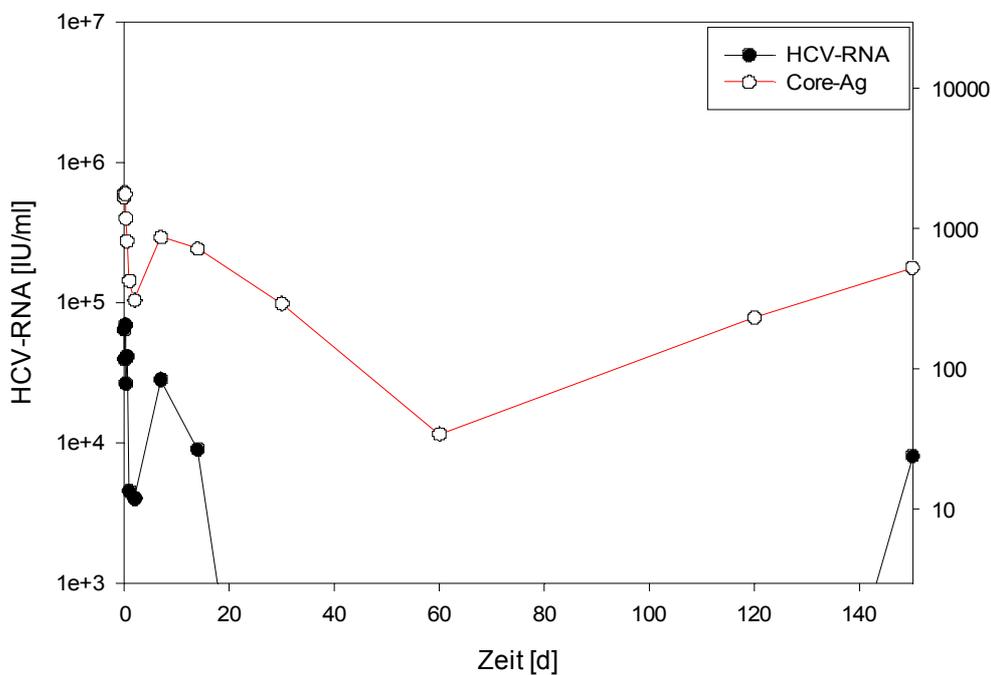


Abbildung 32: Patient 3: HCV-RNA und Core-Ag im zeitlichen Verlauf über fünf Monate

Eben dies konnten wir auch bei den Patienten der ersten HCV-Studie unseres Instituts nachweisen, welche mit IFN- α als Monotherapie behandelt wurden. In dieser Studie kam es bei einem Patienten zu einem Breakthrough, bei einem Patienten zu einem Relapse und bei einem Non-Responder zu einem zwischenzeitlichen Abfall der HCV-RNA unter die Nachweisgrenze. In allen Fällen blieb jedoch das HCV-Core-Ag deutlich länger positiv und fiel erst im Verlauf unter die Nachweisgrenze. Da jedoch die Proben damals mit dem Ortho®Trak-CTM Assay (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, USA, Kat.Nr. 933200RUO) gemessen wurde, welcher eine niedrigere Sensitivität aufweist als der in unserer Studie verwendete Architekt® HCV-Ag-Assay der Fa.Abbott, maßen wir sämtliche Proben der oben genannten Studie nochmals mit dem Architekt-Assay. Dabei stellten wir fest, daß bei diesen drei Patienten sämtliche Proben HCV-Core-Ag positiv waren und dies auch über mehrere Monate nach Therapieende blieben, bis schließlich die Proben wieder HCV-RNA positiv wurden.

In den nachfolgenden Grafiken sind die Verläufe der HCV-RNA, des HCV-Core-Antigens und des Quotienten HCV-RNA/HCV-Core-Ag einiger Patienten exemplarisch dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wählten wir einheitliche Skalierungen für die Darstellung der Kurvenverläufe von HCV-RNA und HCV-Core-Antigen. Lediglich zur Darstellung des RNA/Core-Quotienten passten wir aus Gründen der Übersichtlichkeit die Skalierung dem jeweiligen Wert an.

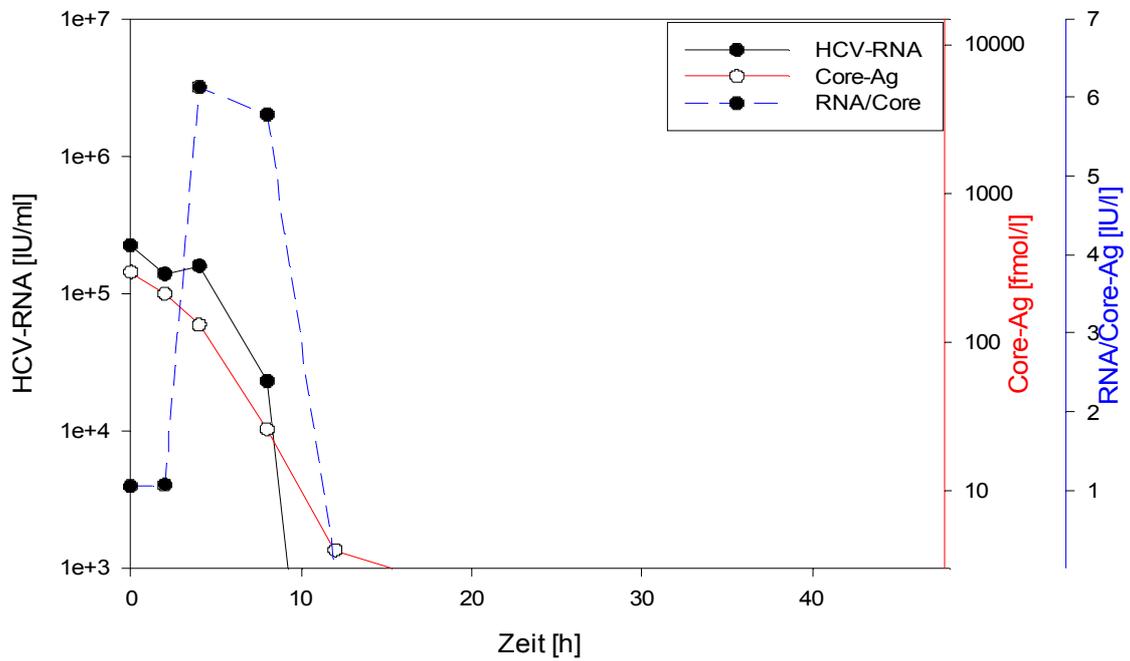


Abbildung 33: Patient 10, männlich, Genotyp 1, Therapiegruppe B, Initial Responder; vor Therapiebeginn RNA/Core-Quotient 1,06, unter Therapie deutliche Zunahme des Quotienten, rasche Viruselimination.

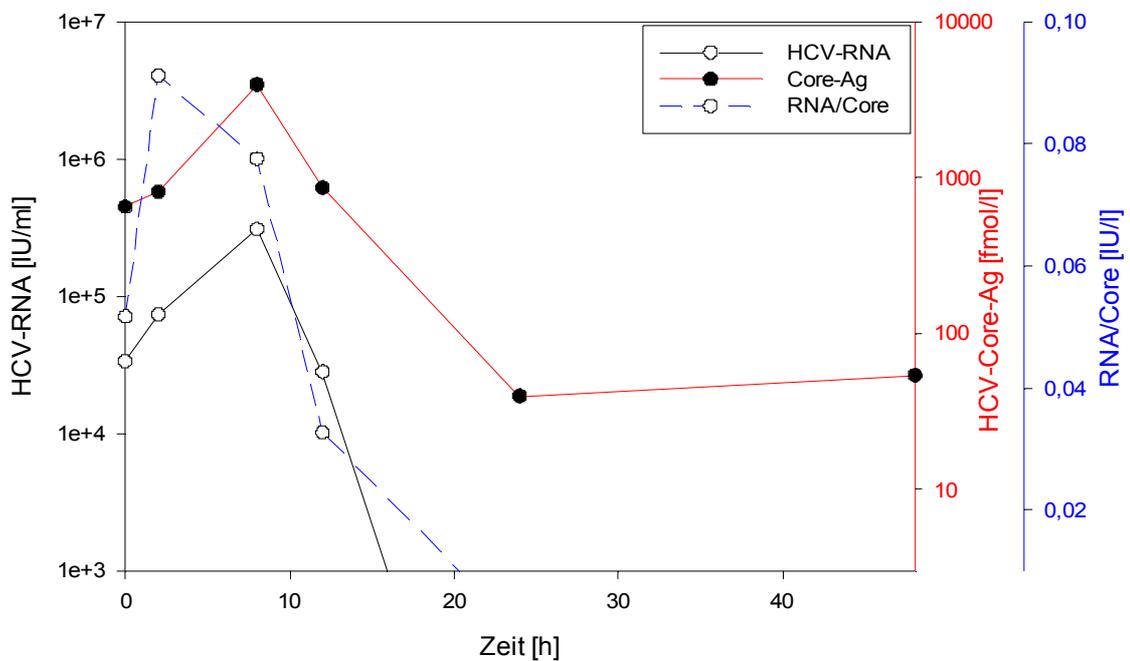


Abbildung 34: Patient 19, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, Initial Responder; unter Therapie deutliche Zunahme des RNA/Core-Quotienten, rasche Viruselimination

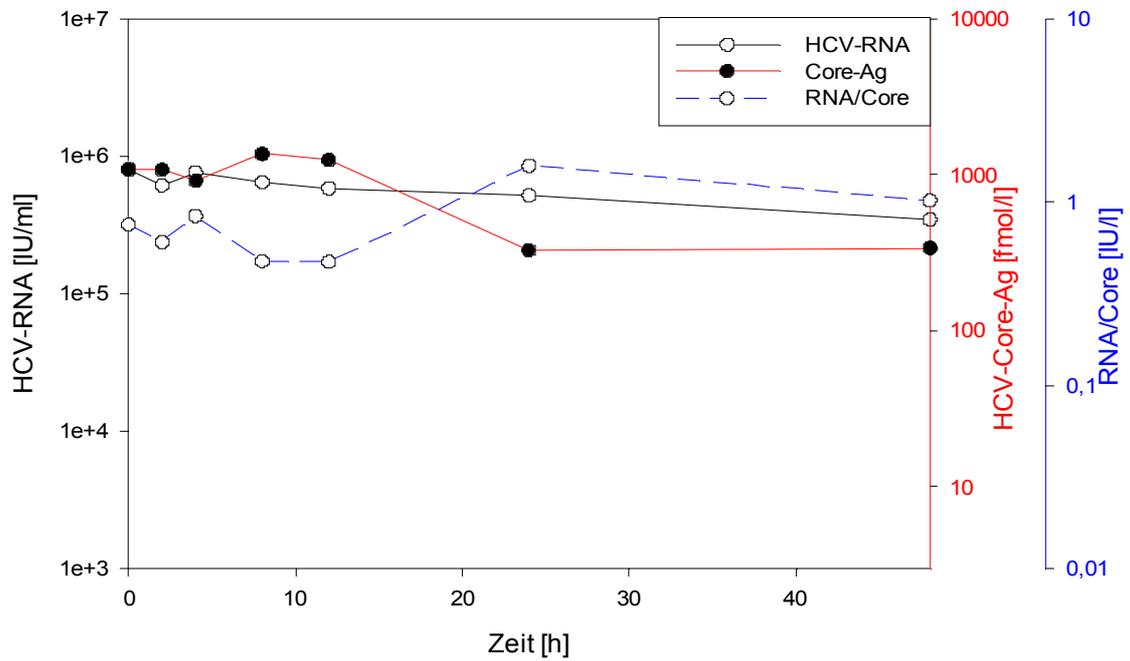


Abbildung 35: Patient 3, männlich, Genotyp 1b, Therapiegruppe A, Delayed Responder, Breakthrough; unter Therapie keine wesentliche Änderung des RNA/Core-Quotienten, sehr träge Viruselimination

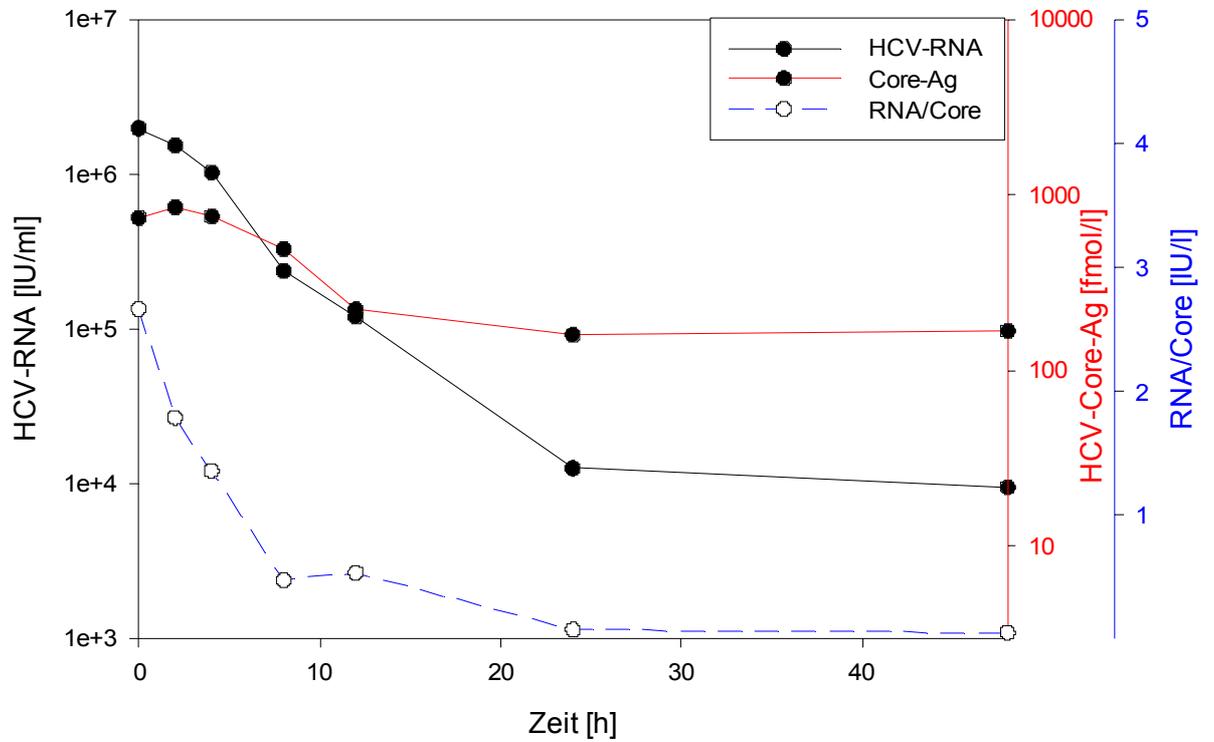


Abbildung 36: Patient 11, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, Initial Responder; vor Therapiebeginn hohe RNA/Core Quotient, unter Therapie Abnahme des Quotienten, träge Viruselimitation

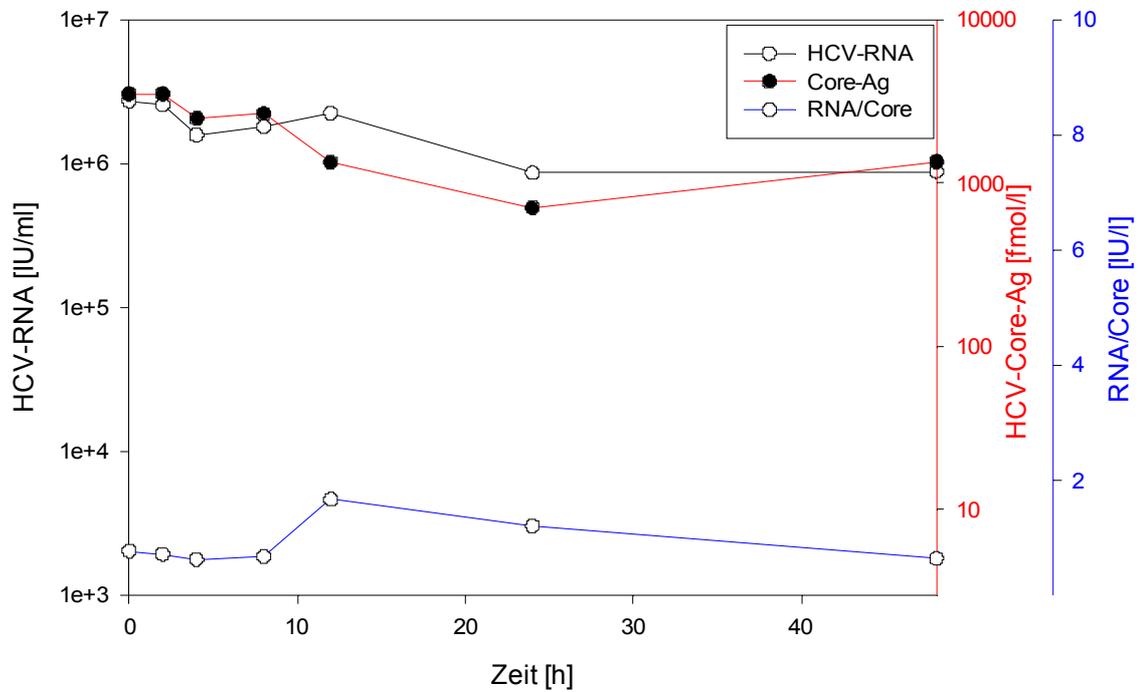


Abbildung 37: Patient 14, männlich, Genoty1, Therapiegruppe A, Non-Responder; unter Therapie keine signifikante Änderung des RNA/Core-Quotienten; keine Viruselimination

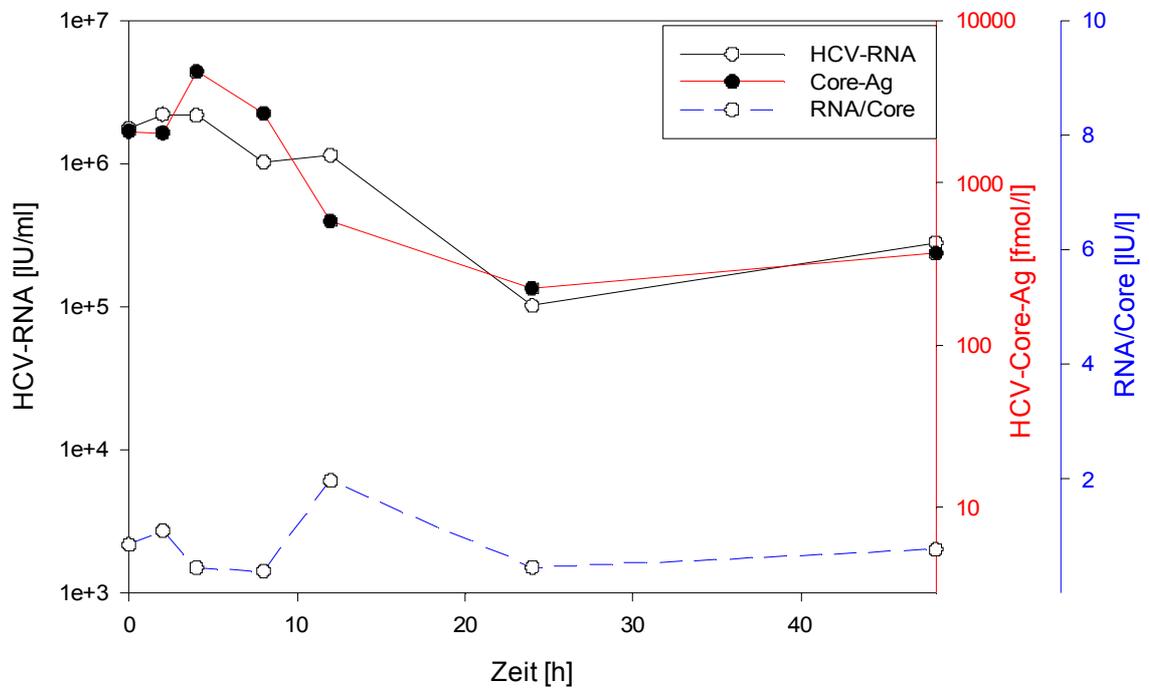


Abbildung 38: Patient 22, männlich, Genotyp 1a, Therapiegruppe B, Non-Responder; unter Therapie keine signifikante Änderung des RNA/Core-Quotienten; keine Viruselimination

4.3. Ferritin-Bestimmung vor Therapiebeginn

Seit einigen Jahren wird ein hoher Ferritin-Wert im Serum vor Therapiebeginn in Zusammenhang mit einem schlechteren Ansprechen auf IFN- α gebracht. Analog dazu werden niedrige Ferritin-Werte als prognostisch günstiger Faktor eingestuft (Zeuzem S, 2004).

Wir untersuchten daher sämtliche Patienten vor Therapiebeginn auf die Ferritin-Werte vor der ersten IFN- α -Applikation. Die Messungen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Anschließend teilten wir die Patienten nach Response-Verhalten auf:

Tabelle 6: Ferritin-Werte nach Response-Muster aufgeteilt

	Initial Responder	Delayed Responder	Non-Responder	Sero-Konverter
Ferritin im Normbereich < 250 ng/ml	7	9	3	2
Ferritin erhöht	3	4	2	-

Anhand dieser Daten lässt sich keine Response-bezogene Korrelation zum Ferritin-Wert herstellen. Auch bei der Berechnung der Mittelwerte der Ferritin-Konzentration in den einzelnen Response-Gruppen zeigte sich keine signifikante Auffälligkeit. Sowohl in der Gruppe der Initial Responder als auch bei den Non Respondern kamen Patienten mit deutlich erhöhten als auch niedrig-normalen Ferritin-Werten vor.

4.4. α -Glutathion-S-Transferase im Bezug zur viralen Kinetik

Die Quantifizierungen der HCV-RNA und des HCV-Core-Antigens ergaben in unseren Untersuchungen drei unterschiedliche Reaktionsmuster der Frühkinetik, die in gleicher Form auch schon in der ersten HCV-Kinetik-Studie unseres Instituts beobachtet wurden. Interessant dabei ist vor allem die Frage, warum die Gruppe der Delayed Responder im Gegensatz zur Gruppe der Initial Responder einen deutlichen Anstieg der HCV-RNA in den ersten Stunden nach Interferon-Applikation zeigt, während die gemittelte Viruslast 48 Stunden nach Therapiebeginn bei beiden Response-Typen keine signifikanten Unterschiede ergibt. Ursache dieses Unterschieds könnte eine massive Leberzellschädigung durch einen Therapie-induzierten Hepatozytenzerfall sein. Inwieweit eine solche Leberzellschädigung bei den einzelnen Response-Typen und Therapiegruppen vorliegt, und ob diese einen Einfluss auf die Therapieprognose hat, soll durch Messung der α -GST ermittelt werden. Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Nachteile, verzichteten wir zum Nachweis einer hepatozellulären Schädigung auf die Bestimmung der ALT und AST und untersuchten ausschließlich die α -GST und zwar jede einzelne Serumprobe, um

insbesondere Veränderungen in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn feststellen zu können (Abb. 39, 40).

Schon vor Therapiebeginn konnten wir bei lediglich drei der 30 Patienten einen α -GST-Wert unter 7,5 ng/ml feststellen, wobei einer dieser drei Patienten zu den beiden Serokonvertern zählt, also bereits zu einem nicht genau bekannten Zeitpunkt vor Therapiebeginn HCV-RNA-negativ war.

Bei allen anderen Patienten lag der Wert bereits vor Therapie deutlich über der Norm.

Tabelle 7: GST-Konzentrationen vor Therapiebeginn

	< 7,5 ng/ml	7,5-20 ng/ml	20-40 ng/ml	> 40 ng/ml
Patienten absolut	3	15	8	4
Patienten prozentual	10 %	50 %	26,67 %	13,33 %

Bemerkenswert dabei erscheint, daß alle Patienten, die initial sehr hohe α -GST-Werte über 40 ng/ml hatten, das gleiche Response-Verhalten zeigten: Es handelte sich um Delayed Responder mit einem signifikantem HCV-RNA-Peak ($p < 0.05$) zwei Stunden nach Interferon-Applikation und anschließend einem sehr raschen Abfall der HCV-Viruslast. Zwei der vier Patienten waren bereits nach zwölf Stunden, alle vier Patienten nach 48 Stunden HCV-RNA negativ und blieben dies auch nach Therapieende im Sinne einer Sustained Response (Abb. 39). Weiterhin konnten wir beobachten, daß diese Patienten auch allesamt einen sehr niedrigen RNA/Core-Quotienten aufwiesen.

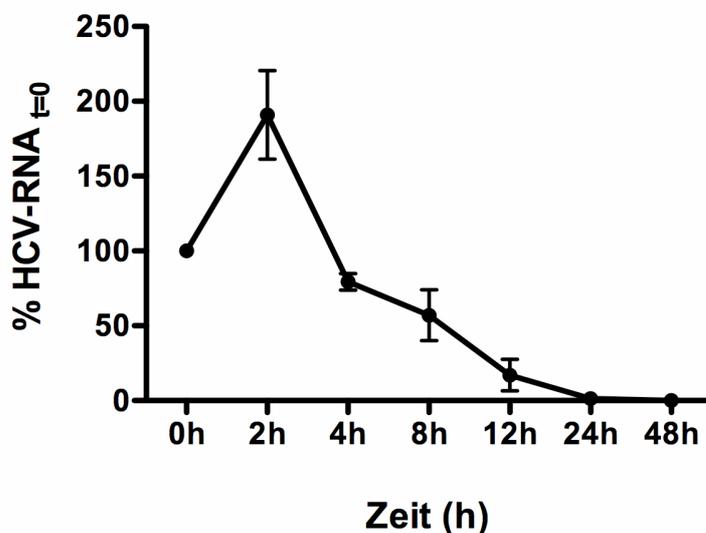


Abbildung 39: Mittlere HCV-RNA-Konzentration aller Patienten mit α -GST-Werten > 40 ng/ml vor Therapiebeginn (n=4)

Analog dazu ließ sich jedoch bei α -GST-Werten im Normbereich sowie leicht bis mäßig erhöhten Werten kein besonderes Response-Verhalten nachweisen. So zeigten manche Patienten mit initial niedrigen α -GST-Werten einen ausgeprägten Anstieg unter Interferon-Therapie, während andere Patienten kaum Veränderung der α -GST-Konzentration zeigten. Jedoch scheint ein Anstieg der α -GST unter Therapie für die Viruselimination von entscheidender Bedeutung zu sein. So fanden wir bei allen Respondern, mit Ausnahme von zwei Delayed Respondern, welche das Virus sehr langsam eliminierten, einen deutlichen Anstieg der GST-Konzentration um mindestens 10 ng/ml. Dieser GST-Peak trat in Therapiegruppe A nach acht Stunden, in der Therapiegruppe B nach zwei bis vier Stunden und als zweiter Peak zwischen zwölf und achtundvierzig Stunden nach Therapiebeginn auf, fiel also, unter Berücksichtigung der verschiedenen Anflutungszeiten von pegyliertem und nicht-pegyliertem Interferon, mit dem Anstieg des Interferon-Plasmaspiegels zusammen. (Abb. 39-45)

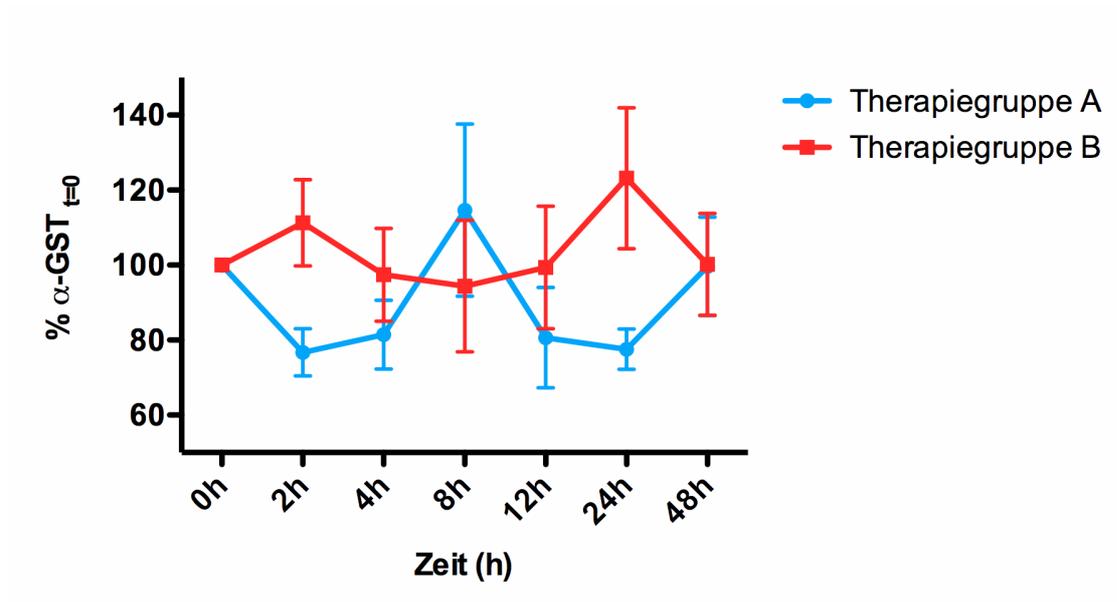


Abbildung 40: Mittlere α -GST Konzentration in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn

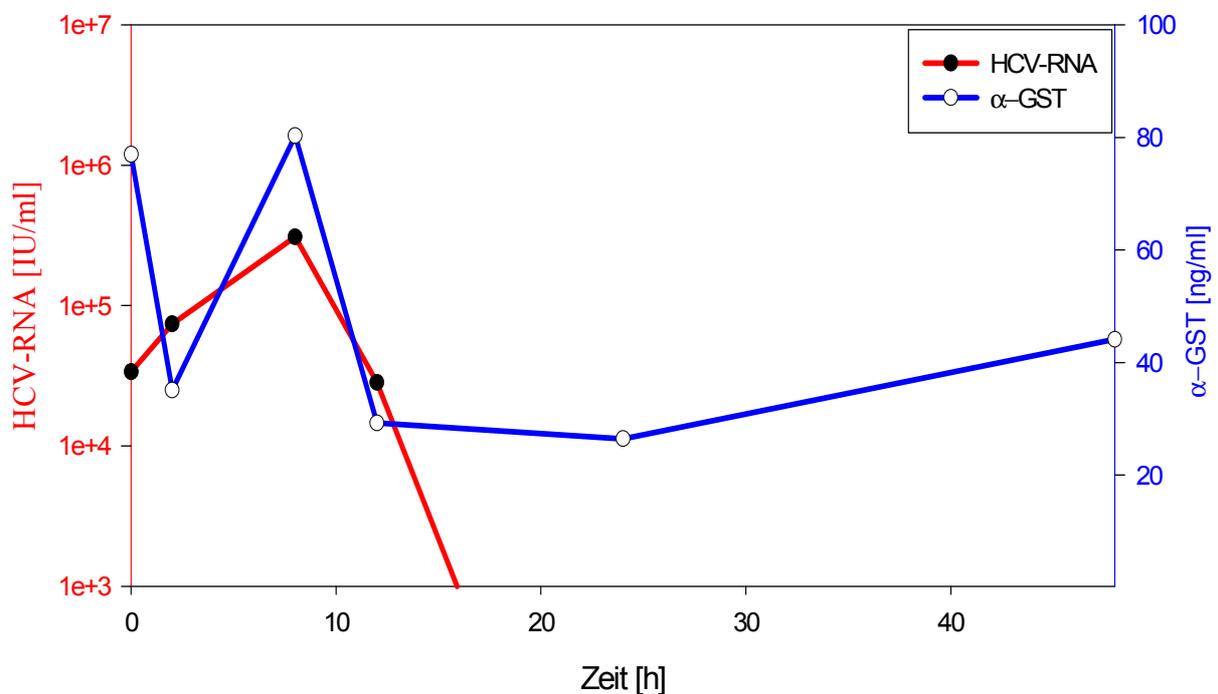


Abbildung 41: Patient 19, Delayed Responder, Therapiegruppe A, vor Therapie sehr hohe α -GST (76,99 ng/ml)

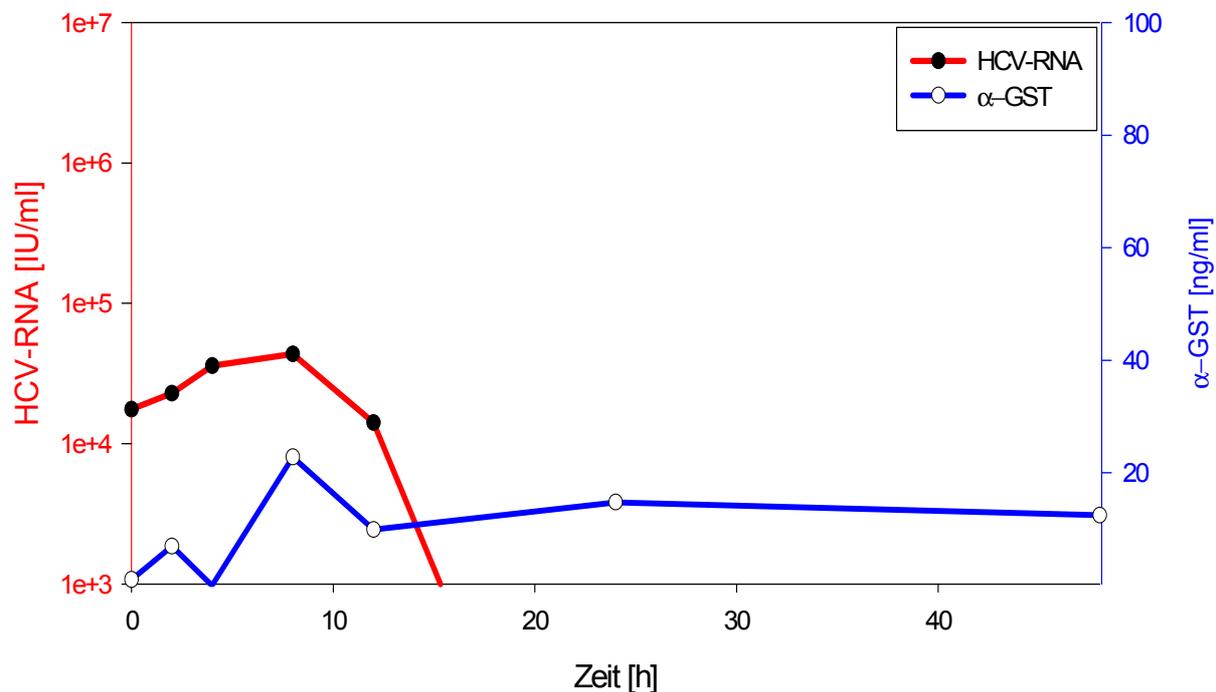


Abbildung 42: Patient 27, Delayed Responder, Therapiegruppe A, vor Therapie niedrige α -GST (1,01 ng/ml), ausgeprägter GST-Anstieg

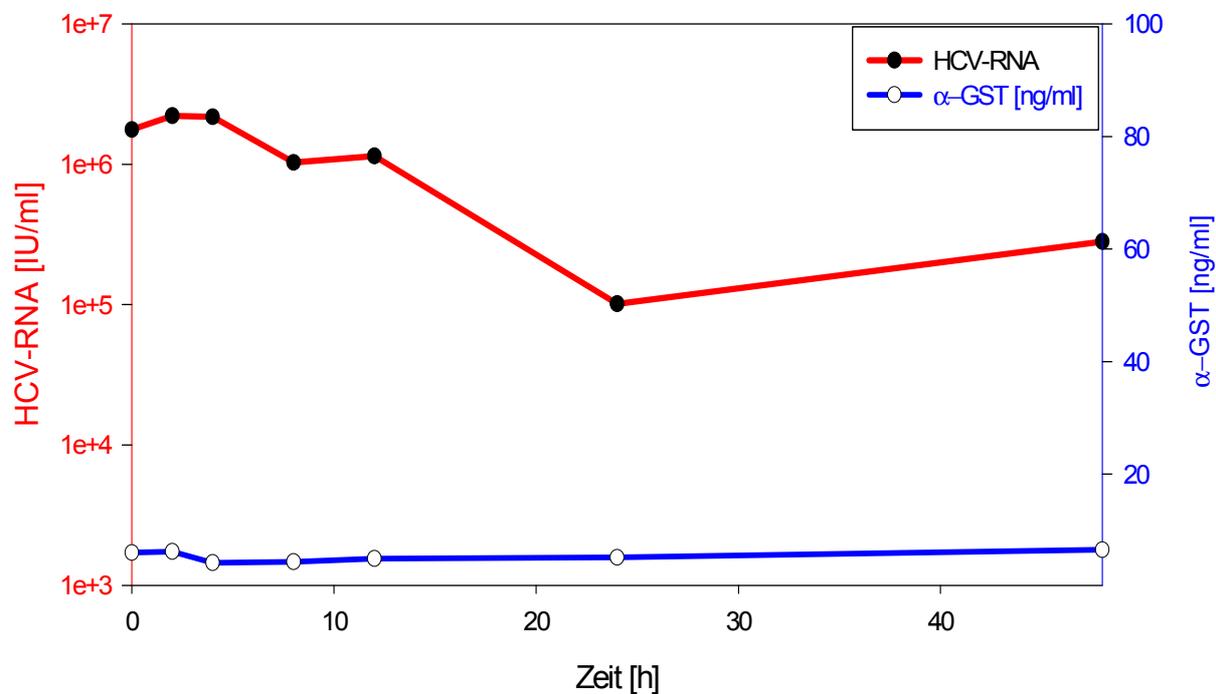


Abbildung 43: Patient 26, Delayed Responder, Therapiegruppe B, vor Therapie niedrige α -GST (6,06 ng/ml), kein GST-Anstieg

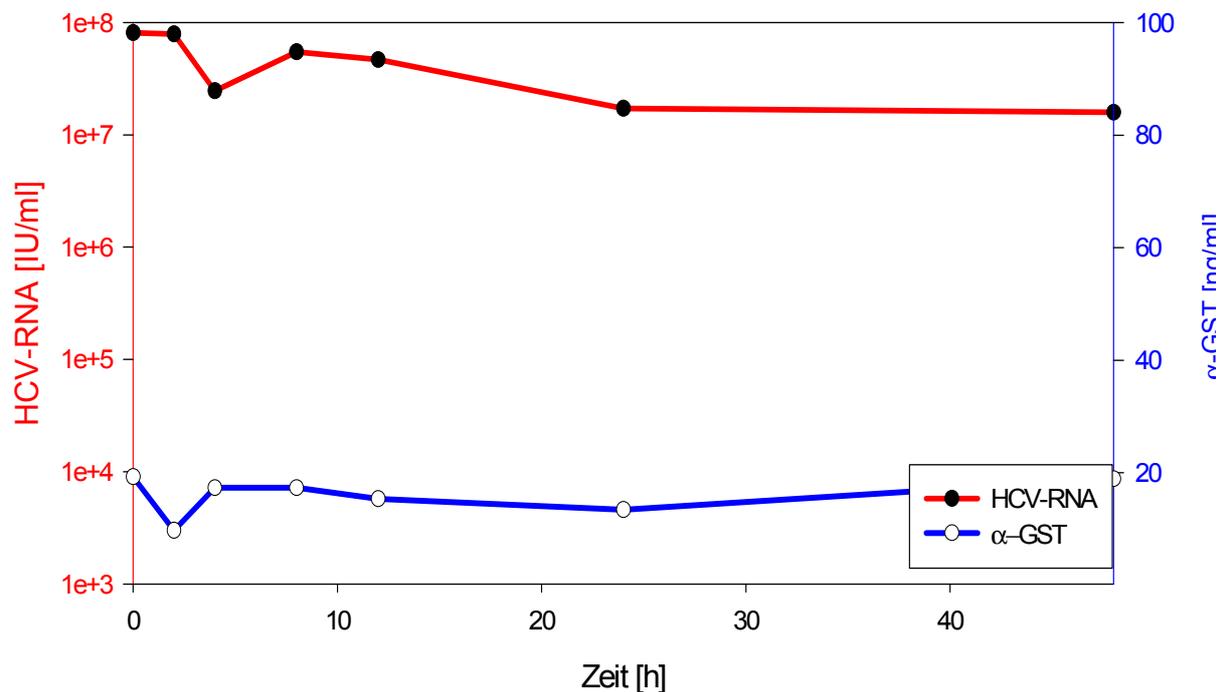


Abbildung 44: Patient 29, Non Responder, Therapiegruppe A, kein GST-Anstieg unter Therapie

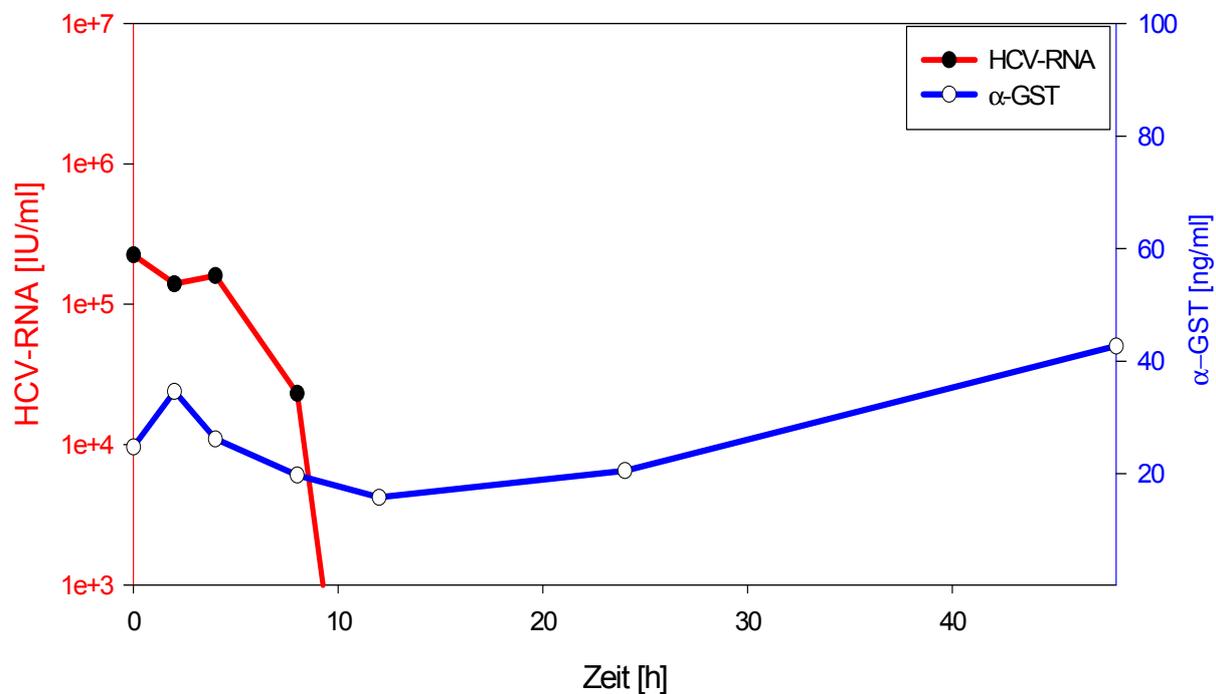


Abbildung 45: Patient 10, Initial Responder, Therapiegruppe B, ausgeprägter GST-Anstieg unter Therapie

Des Weiteren konnten wir zeigen, daß ein deutlicher Zusammenhang zwischen der absoluten Konzentration des HCV-Core-Antigens sowie des HCV-RNA/HCV-Core-Quotienten und der Höhe der α -GST-Konzentration besteht. So zeigten Patienten mit hohen α -GST-Werten niedrigere HCV-Core-Antigen Konzentrationen als Patienten mit niedrigeren α -GST-Werten. Zur Verdeutlichung folgende Graphik:

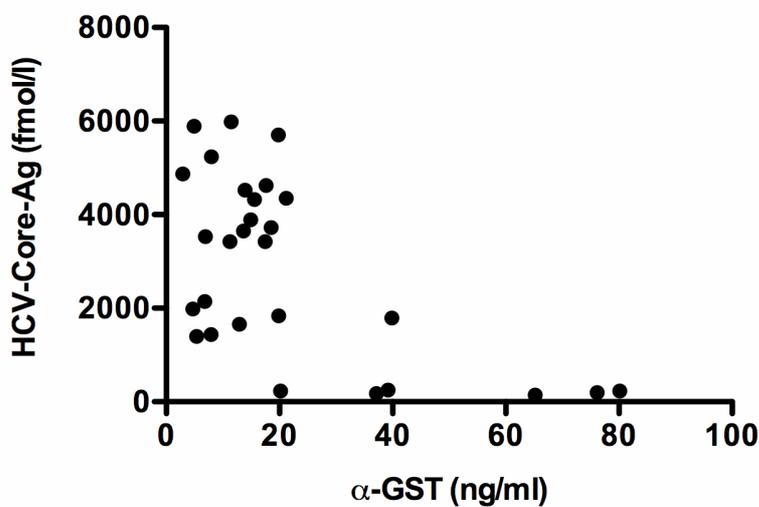


Abbildung 46: Lineare Darstellung der Beziehung zwischen initialer α -GST-Konzentration und initialer HCV-Core-Ag-Konzentration ($n=28$, $r^2=-0.6049$, $p<0.001$)

Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits auf die Tatsache hingewiesen, daß es bei einigen Patienten zu einem Abfall der HCV-RNA unter die Nachweisgrenze kam, während das Core-Antigen noch nachweisbar war. Bei diesen Patienten untersuchten wir in jenen Proben auch die Konzentration der α -GST und stellten dabei fest, daß diese ebenfalls in allen Proben erhöht war, in denen das Core-Protein noch nachweisbar war. Erst mit dem Abfall des Core-Proteins unter die Nachweisgrenze von 3 fmol/l sank auch die α -GST auf Werte unter 7,5 ng/ml, also in den Normbereich. Exemplarisch dazu einige ausgewählte Patientenverläufe

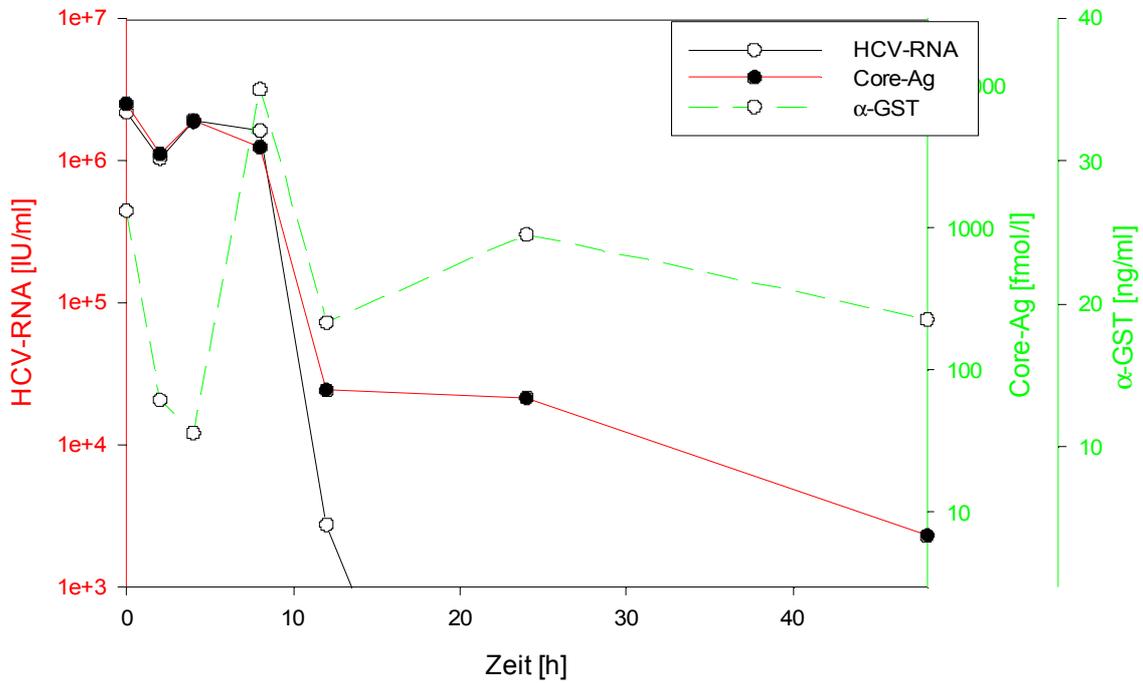


Abbildung 47: Patient 5, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, Initial Responder

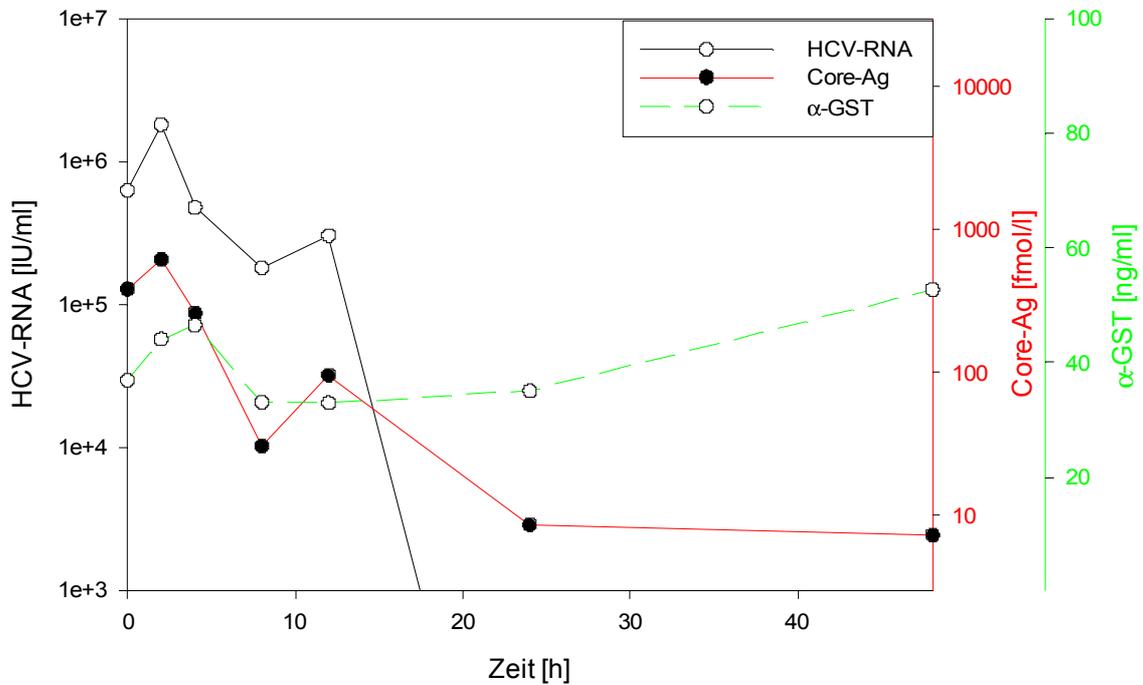


Abbildung 48: Patient 12, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, Delayed Responder

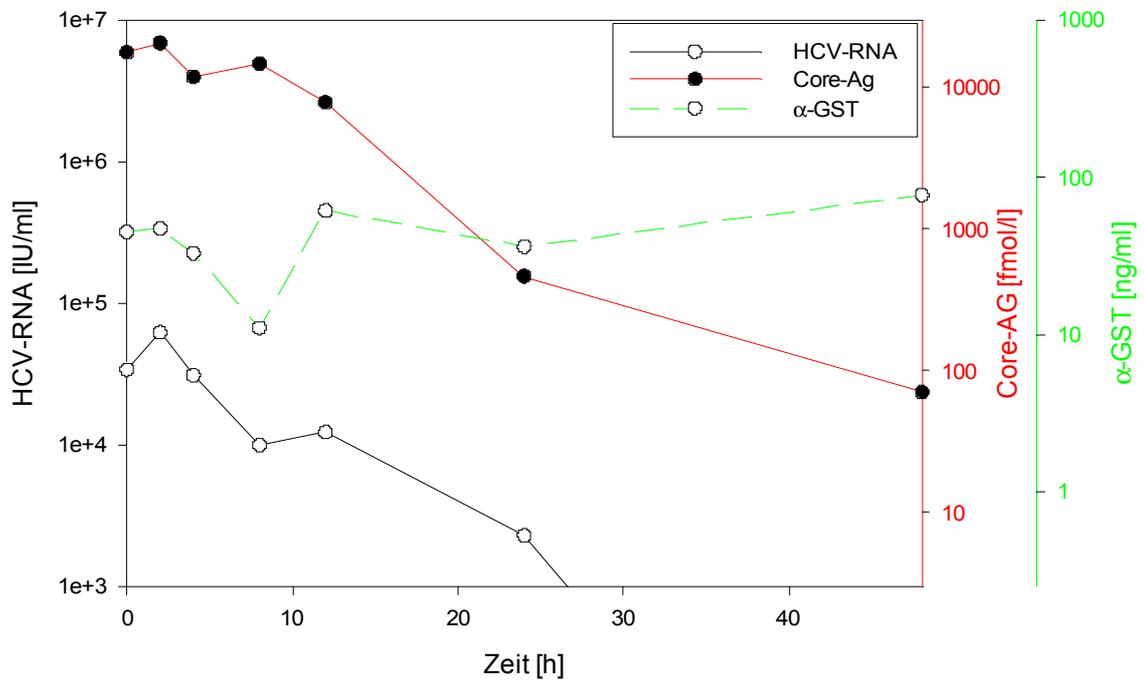


Abbildung 49: Patient 15, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, Delayed Responder

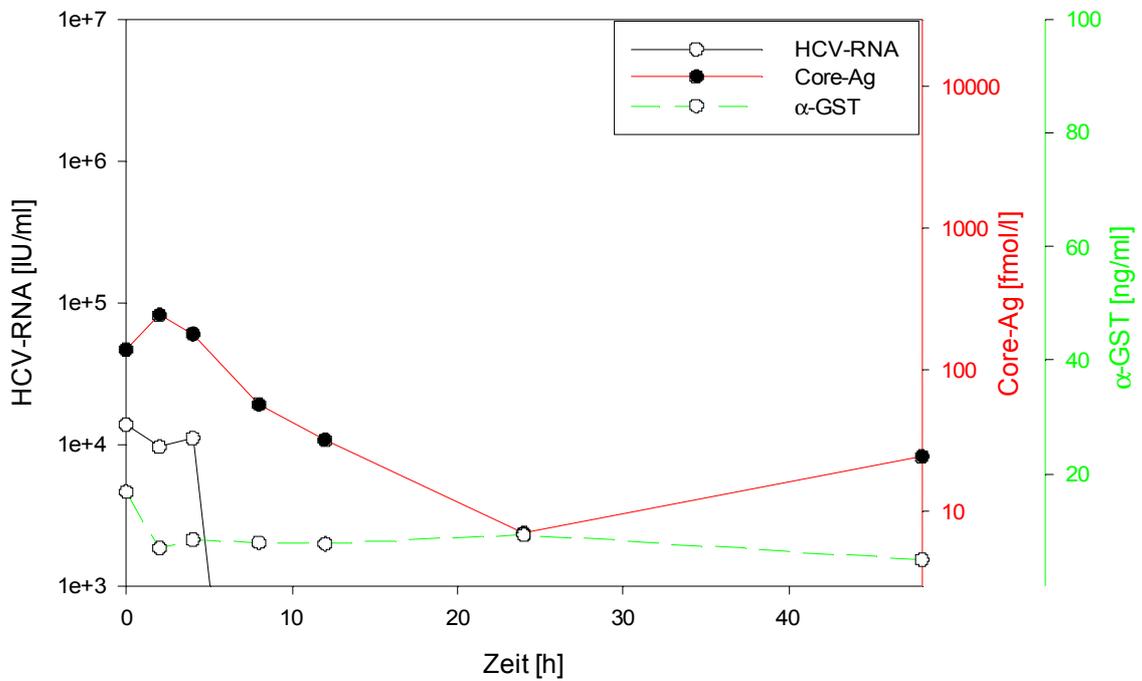


Abbildung 50: Patient 18, männlich, Genotyp 3a, Therapiegruppe B, Initial Responder

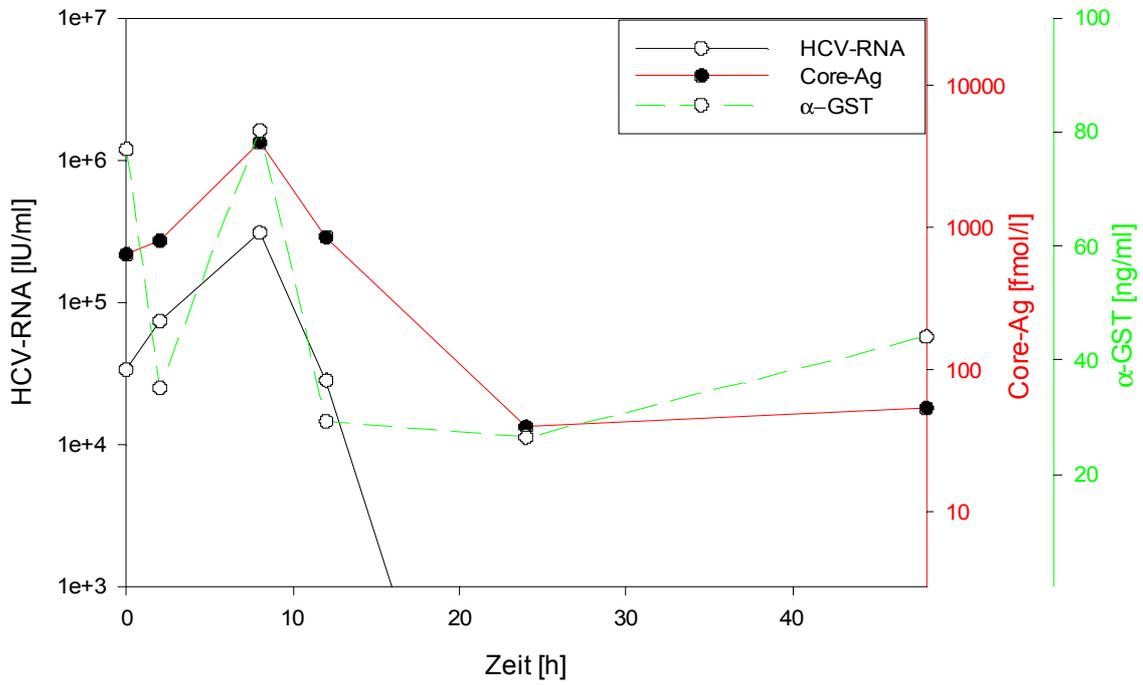


Abbildung 51: Patient 19, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe A, Delayed Responder

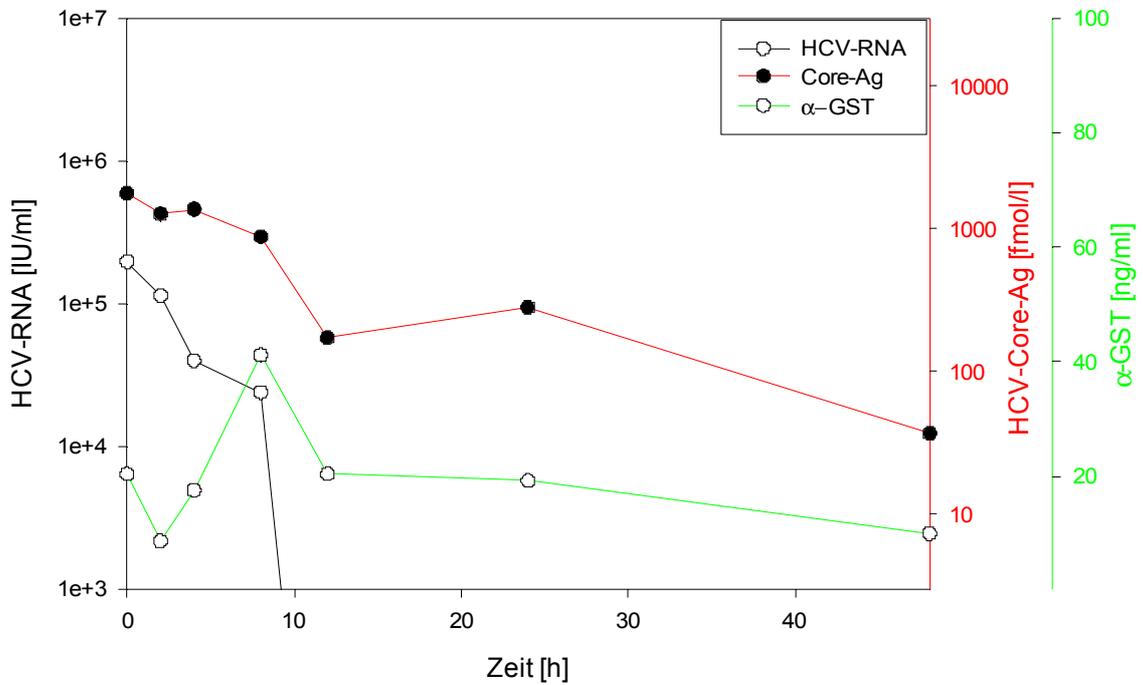


Abbildung 52: Patient 20, weiblich, Genotyp 3a, Therapiegruppe B, Initial Responder

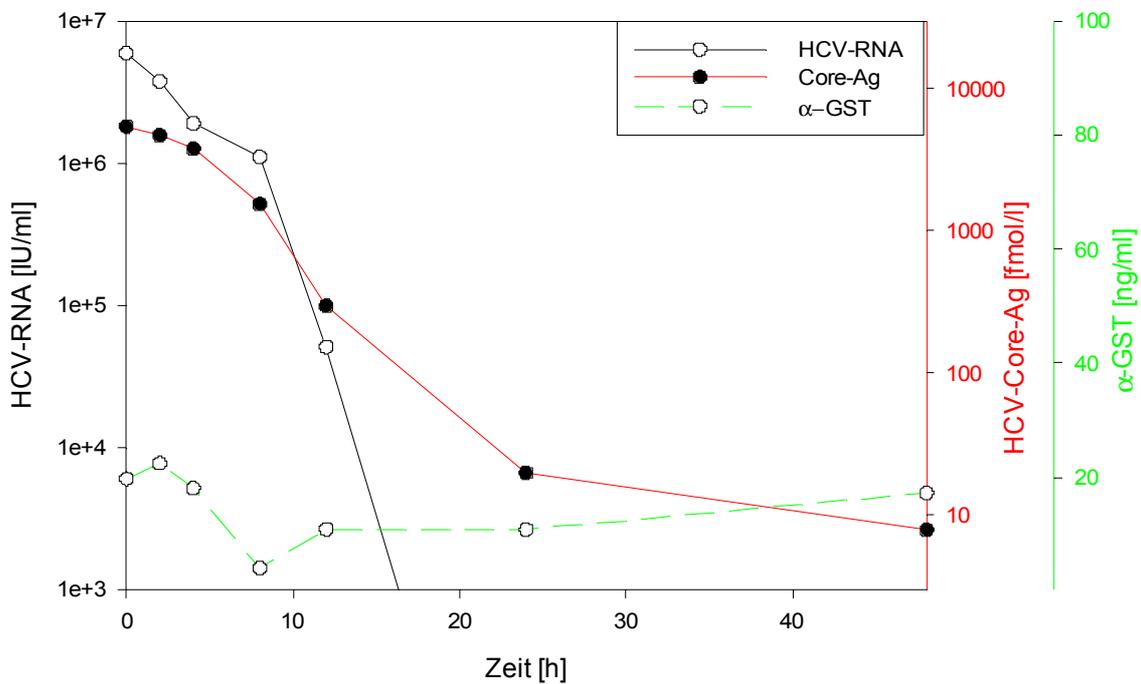


Abbildung 53: Patient 8, männlich, Genotyp 2b, Therapiegruppe B, Initial Responder

4.6. TTV-Viruslast und TTV-Frühkinetik

Gegenstand unserer Untersuchungen sollte sein, darzustellen, inwieweit eine vorliegende Infektion mit dem TT-Virus in Zusammenhang mit der Interferon-Response des Patienten steht, ob die Höhe der TT-Viruslast Einfluss auf Therapiereponse und Leberzellschädigung hat und schließlich, ob das TT-Virus selber auf die Gabe von Interferonen reagiert. Dazu untersuchten wir zunächst jede Serumprobe der Patienten zum Zeitpunkt $t=0$, um herauszufinden, ob zum Zeitpunkt des Therapiebeginns eine Infektion mit TTV vorlag. Hierbei ergab sich folgendes Verteilungsmuster: Vor Therapiebeginn waren 18 Patienten TTV-positiv, 12 Patienten TTV-negativ. Bei diesen 12 Patienten erfolgten keine weiteren Messungen, von allen TTV-positiven Patienten wurde jedoch wie zuvor bei der HCV-Quantifizierung eine Kinetik der ersten 48 Stunden erstellt und die Langzeitverläufe beobachtet.

Zunächst untersuchten wir anhand tabellarischer Daten, ob ein Zusammenhang zwischen einer TTV-Infektion und dem HCV-Response-Verhalten besteht.

Tabelle 8: TTV-Verteilung bei verschiedenen HCV-Response-Typen

	HCV-Initial Responder	HCV-Delayed Responder	HCV-Non Responder	Serokonverter
TTV-positiv	6	9	3	-
TTV-negativ	4	4	2	2

Insgesamt zeigten sich hierbei keinerlei Auffälligkeiten.

Auch bei weitergehender Betrachtung der statistischen Daten konnte keine signifikante Auffälligkeit hinsichtlich der Korrelation zwischen TTV-Viruslast und HCV-Viruslast gefunden werden. So steht weder eine hohe HCV-RNA-Konzentration in Zusammenhang mit einer hohen TTV-Viruslast noch umgekehrt. Auch die Höhe der leberzellspezifischen α -GST korreliert nicht mit der Höhe der TTV-DNA.

Gegenstand weitere Untersuchungen war nun das Ansprechen von Interferon auf das TT-Virus, insbesondere das Ansprechen in der Frühphase der Therapie. Hierzu maßen wir zunächst die TTV-DNA-Konzentration in den Serumproben aller Patienten und untersuchten die Kinetik, getrennt nach Therapiegruppen, in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn. Dabei ergab sich ein überraschendes Ergebnis: Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen beim Hepatitis-C-Virus zeigte sich beim TT-Virus in Therapiegruppe B ein deutlicher Peak der TTV-Viruslast in den ersten Stunden nach Therapiebeginn.

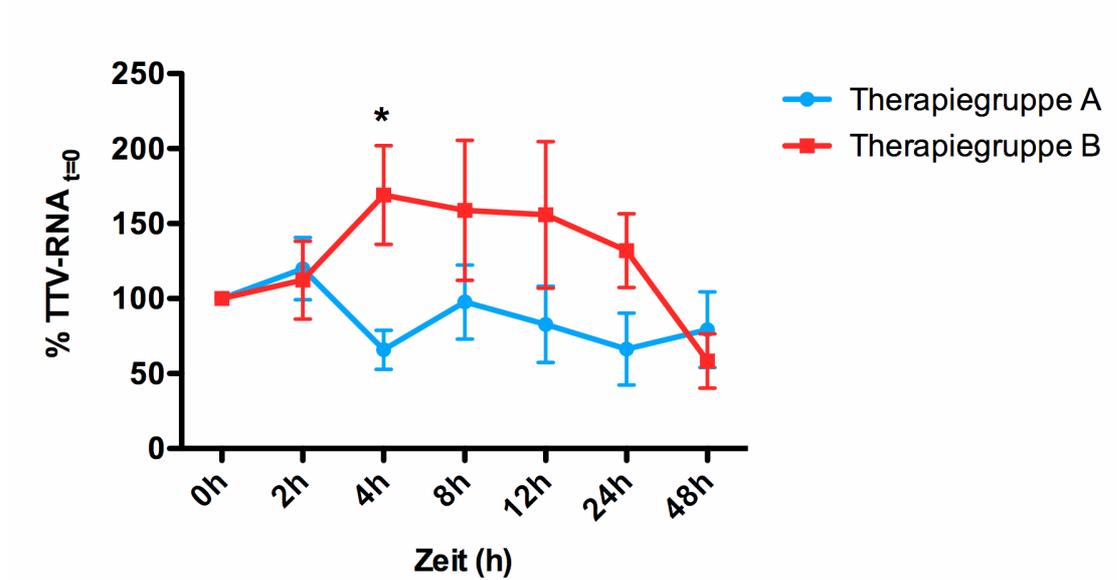


Abbildung 54: Mittlere TTV-DNA-Konzentration in den initialen 48h der Therapie in Therapiegruppe A und B (Therapiegruppe A: n=10, Therapiegruppe B: n=8; * p<0.05)

Betrachtet man nun die TTV-DNA-Kinetik über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Therapiebeginn, so fällt auf, daß beide Therapiegruppen nach zwei Tagen einen kontinuierlichen Abfall der TTV-Viruslast aufweisen.

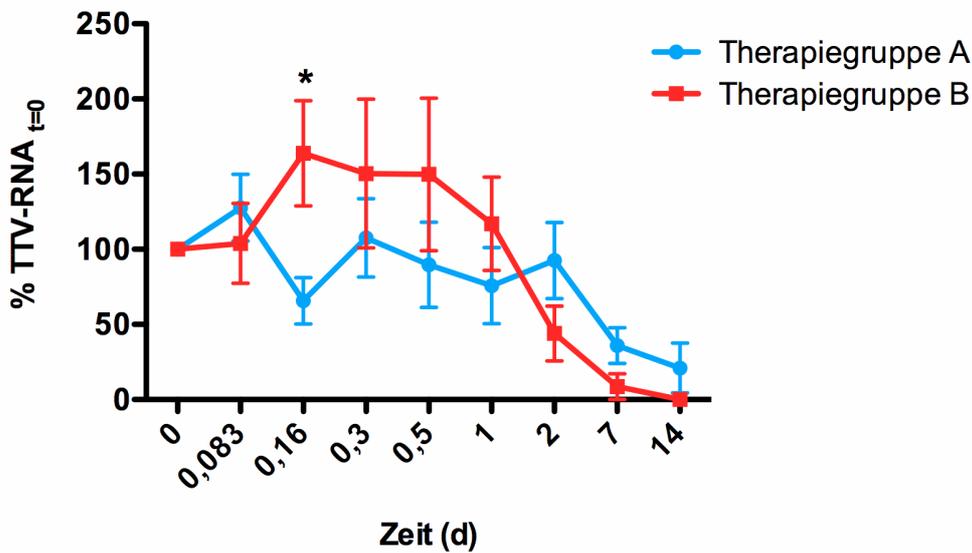


Abbildung 55: Mittlere TTV-DNA-Konzentration in den ersten 14 Tagen der Therapie in Therapiegruppe A und B (Therapiegruppe A: n=10, Therapiegruppe B: n=8; * p<0.05)

Bei der Betrachtungen der individuellen TTV-Kinetiken fällt auf, daß das TT-Virus ebenfalls auf Interferon anspricht. So blieben von den ursprünglich 18 TTV-positiven Patienten am Therapieende nur noch vier Patienten übrig, bei denen das TT-Virus nachweisbar war. Alle anderen Patienten waren TTV-negativ. Allerdings ließen sich bei TTV keine einheitlichen Reaktionsmuster analog zu HCV darstellen. Auch das HCV-Response-Verhalten korrelierte nicht mit dem Ansprechen von TTV auf Interferon. Im Folgenden sind verschiedene Patienten-Graphiken dargestellt, um das heterogene Verteilungsmuster von HCV-Respondern, HCV-Non Respondern, TTV-Respondern und TTV-Non Respondern zu verdeutlichen:

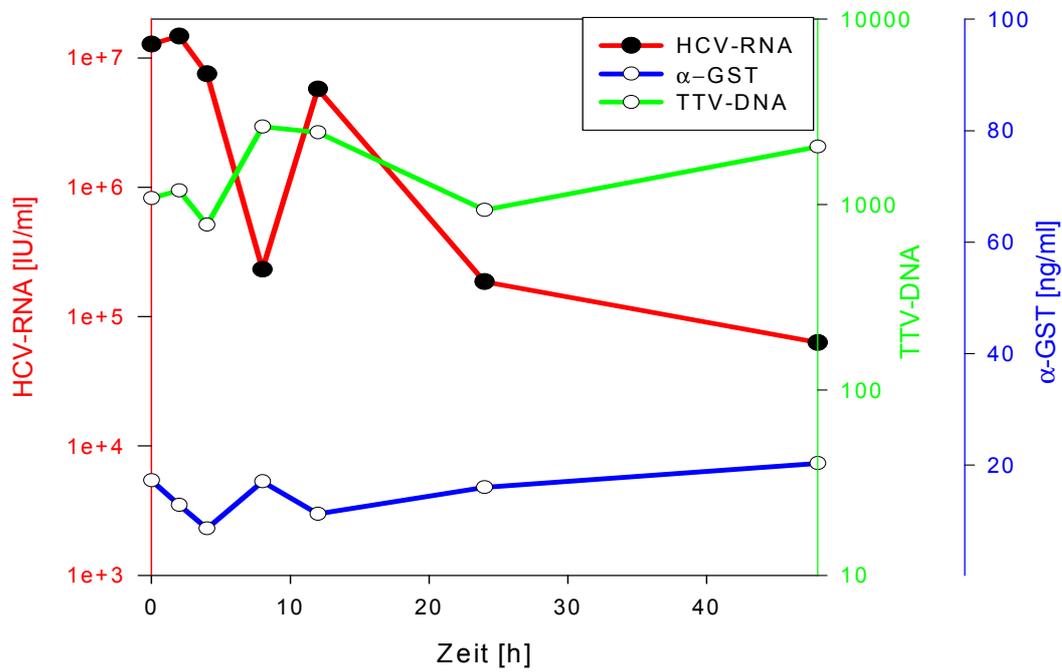


Abbildung 56: Patient 2, HCV Delayed responder, TTV Non Responder, Therapiegruppe A

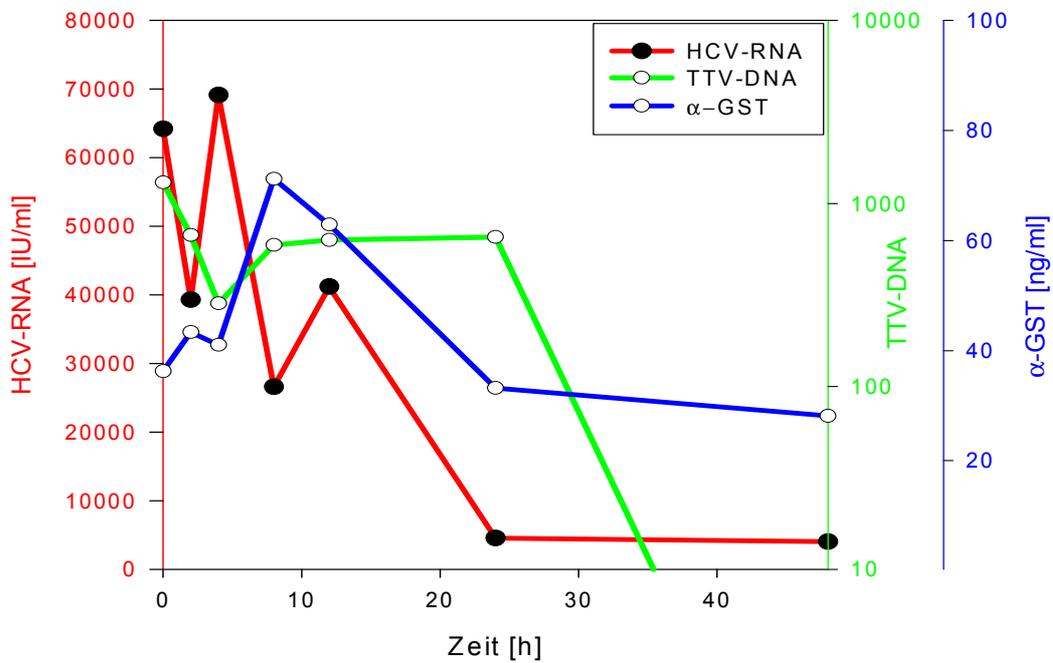


Abbildung 57: Patient 3, HCV Delayed responder, TTV Responder, Therapiegruppe A

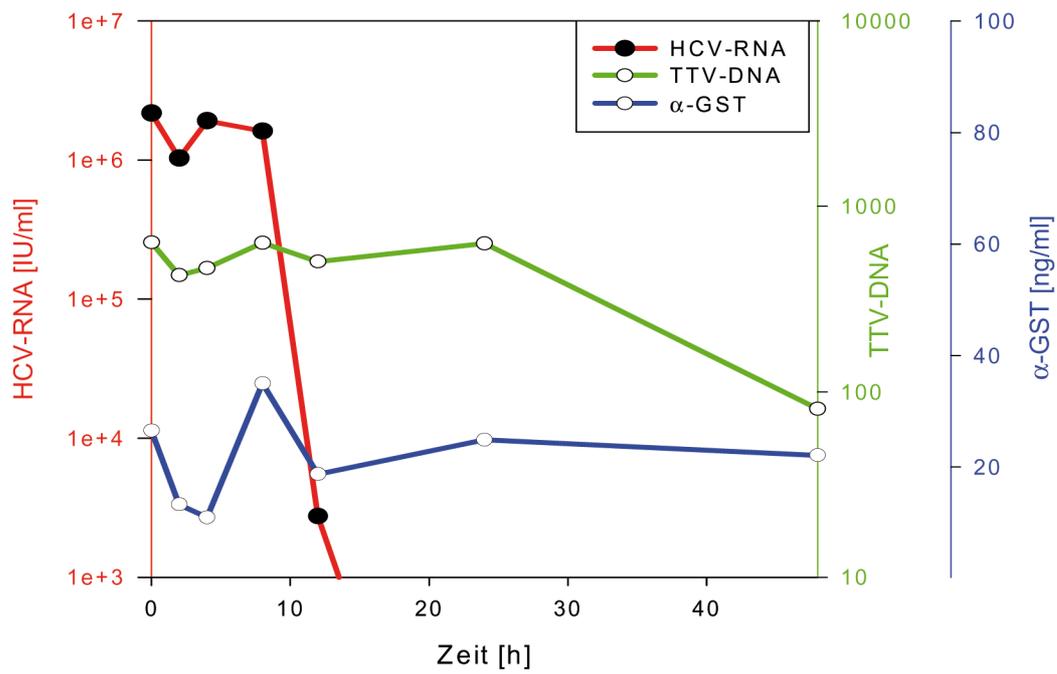


Abbildung 58: Patient 5, HCV-Initial Responder, TTV-Responder, Therapiegruppe A

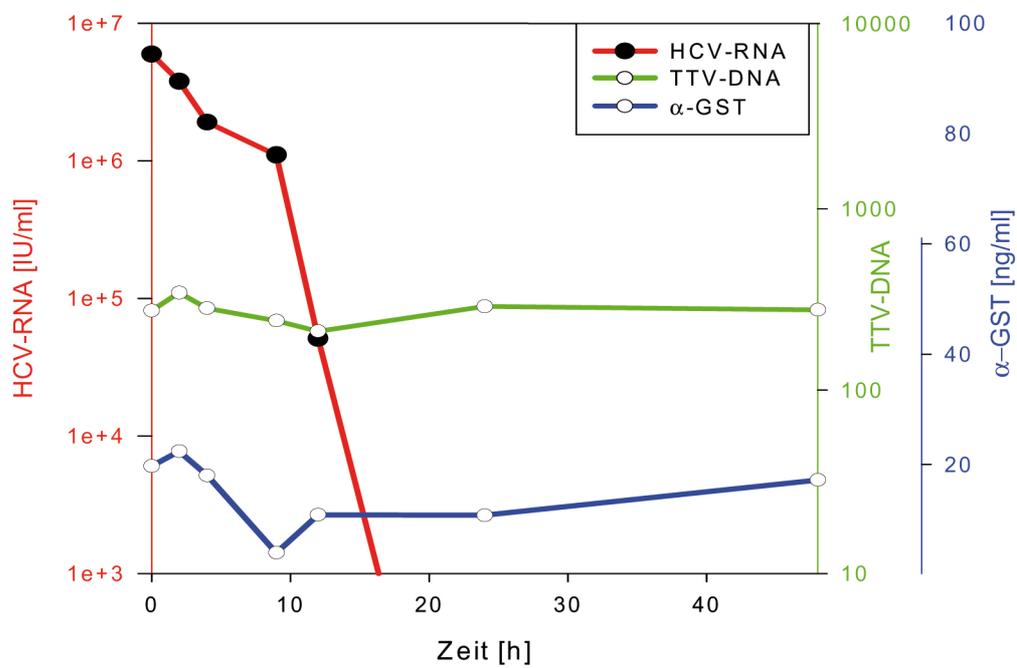


Abbildung 59: Patient 8, HCV-Initial Responder, TTV-Non Responder, Therapiegruppe B

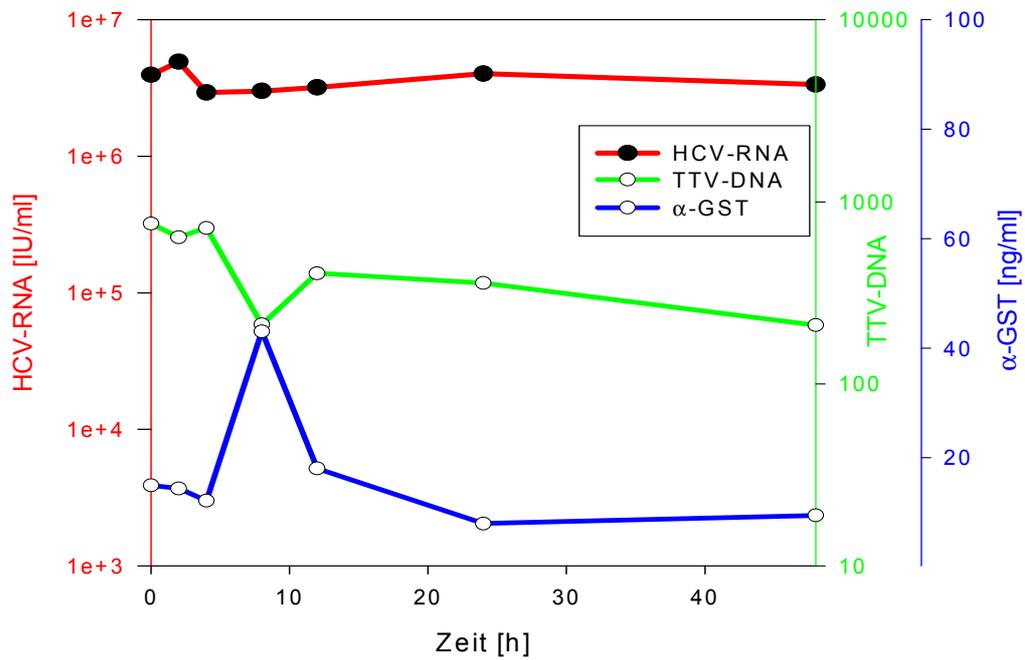


Abbildung 60: Patient 9, HCV-Non Responder, TTV-Responder, Therapiegruppe A

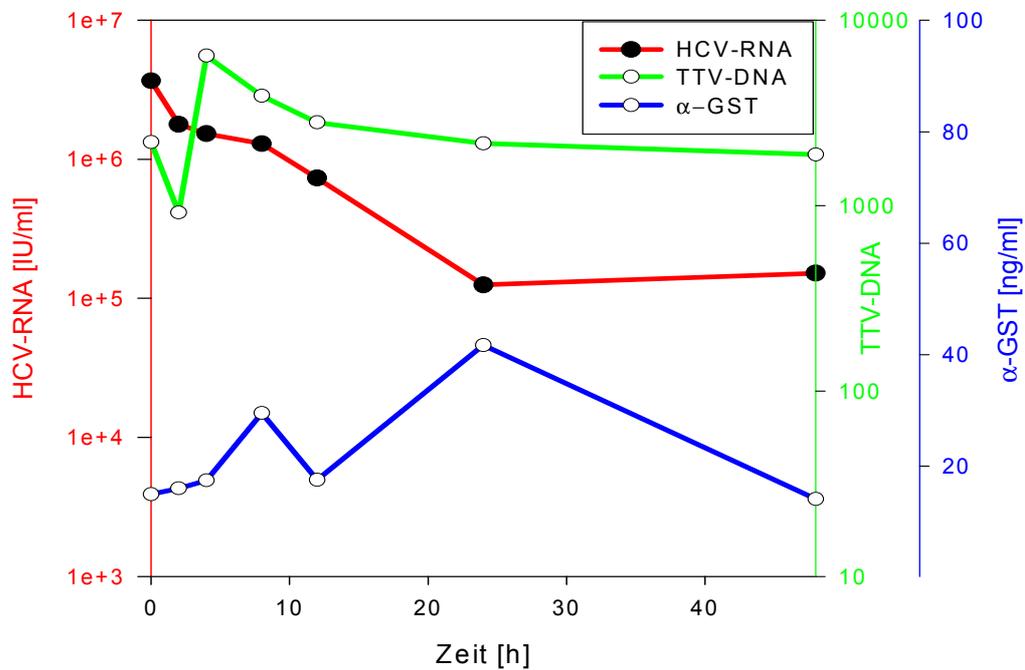


Abbildung 61: Patient 16, HCV-Initial Responder, TTV-Responder, Therapiegruppe B

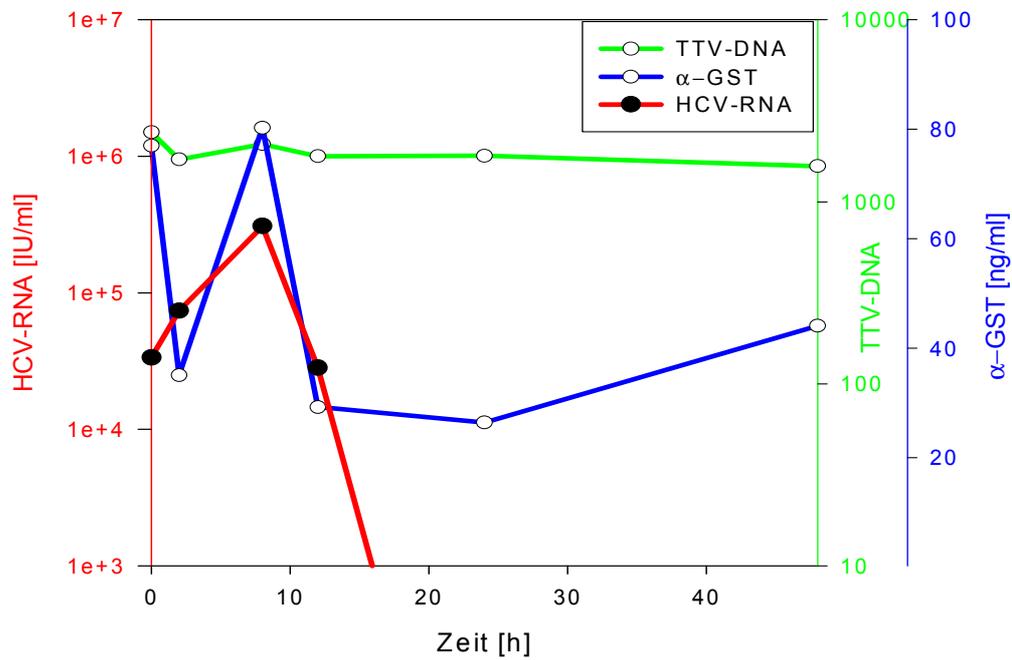


Abbildung 62: Patient 19, HCV-Delayed Responder, TTV-Non Responder, Therapiegruppe A

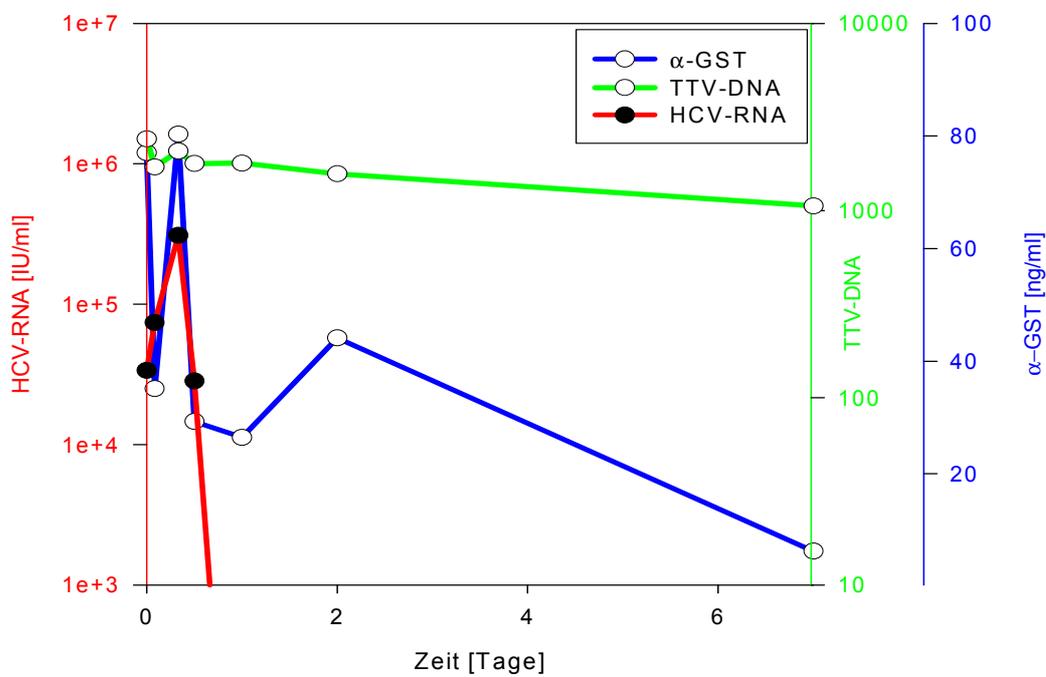


Abbildung 63: Patient 19, Verlauf über die ersten sieben Tage nach Therapiebeginn

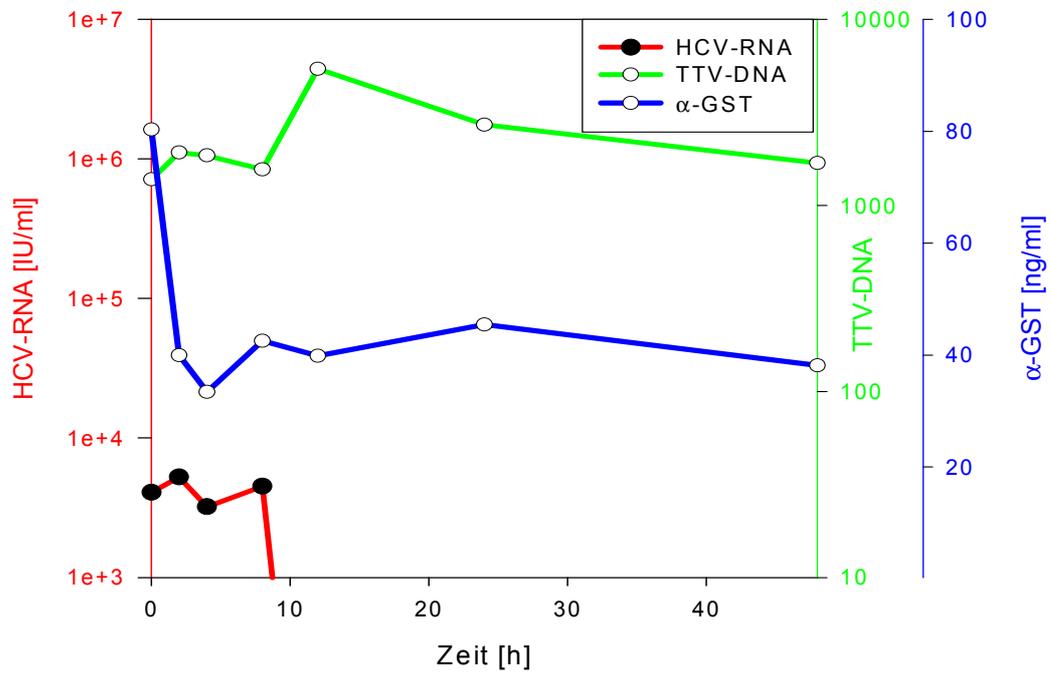


Abbildung 64: Patient 24, HCV-Delayed Responder, TTV-Non Responder, Therapiegruppe B

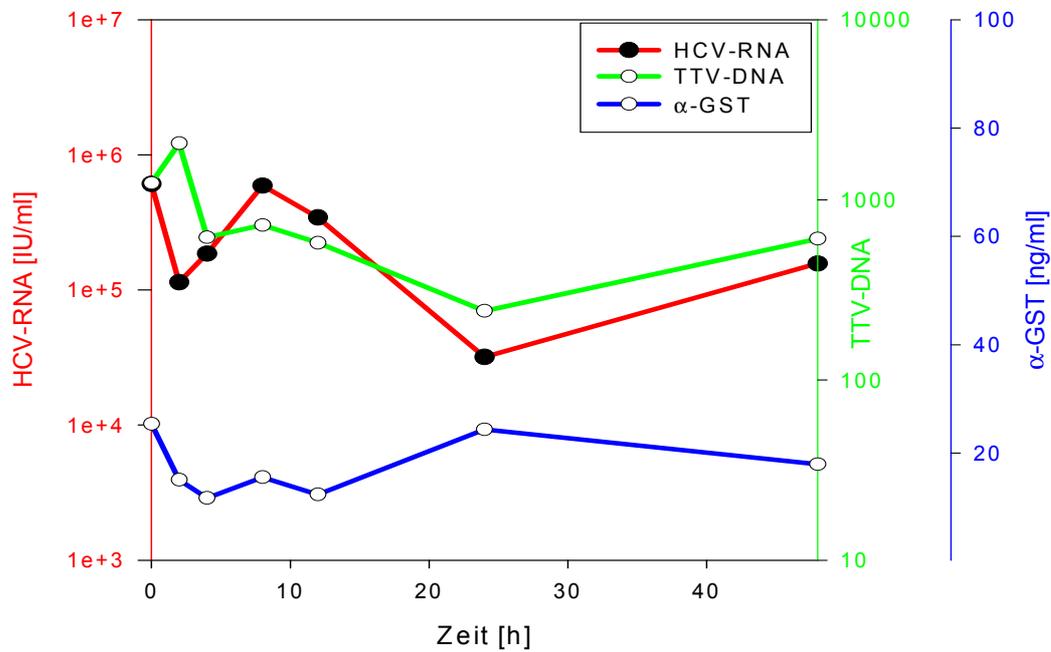


Abbildung 65: Patient 25, HCV-Non Responder, TTV-Responder, Therapiegruppe A

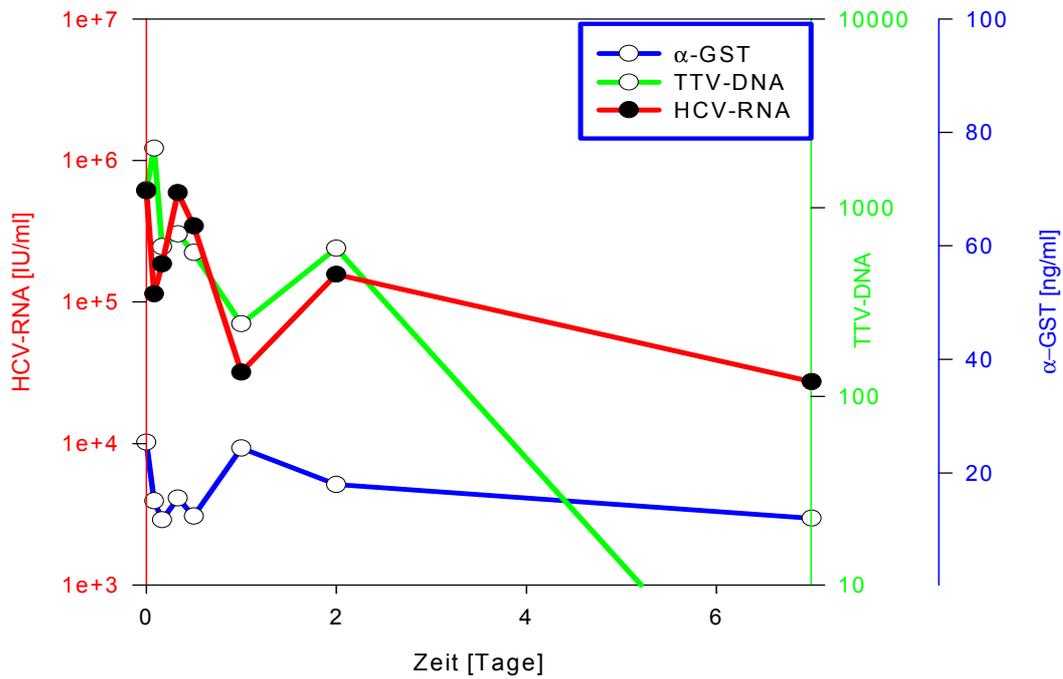


Abbildung 66: Patient 25, Verlauf über die ersten sieben Tage nach Therapiebeginn

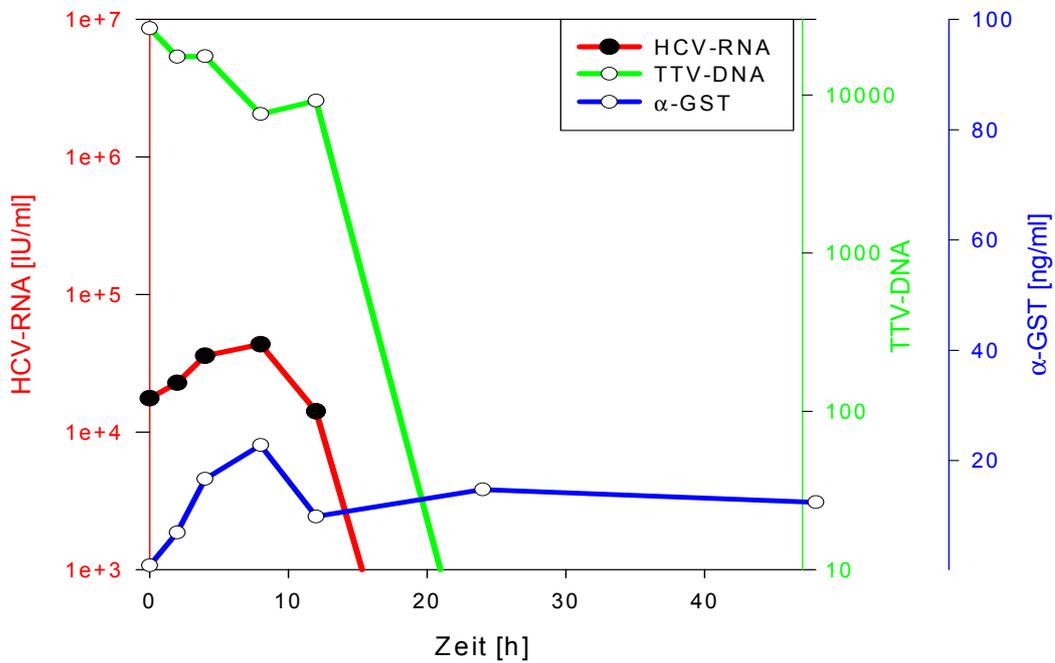


Abbildung 67: Patient 27, HCV-Delayed Responder, TTV-Responder, Therapiegruppe A

5. Diskussion

5.1. Pegyliertes Interferon plus Interferon- α : Therapie der Zukunft?

Seit Zulassung und Empfehlung der European Association for the Study of the Liver (EASL) der Kombinationstherapie von Interferon und Ribavirin zur Behandlung der chronischen Hepatitis C im Jahre 1999, hat sich die Prognose von Patienten mit chronischer Hepatitis C entscheidend verbessert. Bei den Genotypen 2 und 3 konnten schon damals Sustained Response-Raten von etwa 65 % erreicht werden. Diese Erfolgsquote konnte durch die Einführung der pegylierten Interferone und der Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon plus Ribavirin auf 75-80% nochmals gesteigert werden. Ein Problem stellen jedoch nach wie vor die Genotypen 1 und 4 dar, welche bislang, trotz Einführung der pegylierten Interferone und Verlängerung der Therapiedauer auf zwölf Monate, noch immer dauerhafte Heilungsraten unter 50 % aufweisen. Da jedoch die Genotypen 1a und 1b in Europa die häufigsten Genotypen darstellen, gilt es, neue Therapieoptionen zur Verbesserung der Therapieprognose zu finden.

Das Problem einer IFN- α plus Ribavirin-Kombinationstherapie besteht darin, daß das Interferon, bedingt durch seine Pharmakokinetik, zwar sehr schnell anflutet, ebenso rasch jedoch wieder abfällt. Dadurch kommt es zu erheblichen Spitzen und Tälern der IFN- α -Serumkonzentration.

Diese Konzentrationsschwankungen wurden durch die Einführung der pegylierten Interferone behoben, da diese durch ihre verzögerte Freisetzung zu konstanten Serumspiegeln führen. Ein denkbarer Nachteil der pegylierten Interferone ist jedoch ihre langsame Anflutungszeit. Erst nach ca. 70 Stunden erreicht das pegylierte Interferon seine Höchstkonzentration im Serum. Insbesondere in den ersten Stunden nach PEG-IFN- α -Gabe sind die Serumspiegel hingegen sehr niedrig.

Diese Unterschiede in der Pharmakokinetik wollte sich das Therapiekonzept der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie zunutze machen. Daher wurde die derzeitige Therapieempfehlung aus PEG-IFN- α und Ribavirin (in Kapitel 1.5 beschrieben) mit einer zusätzlichen Gabe von IFN- α einmalig unmittelbar vor Therapiebeginn kombiniert

(Therapiegruppe B) und mit den Ergebnissen der Kombinationstherapie aus PEG-IFN- α und Ribavirin (Therapiegruppe A) verglichen.

Leider ergab sich bei der Auswertung, daß trotz doppelter Verblindung und Randomisierung die Zusammensetzung der Therapiearme hinsichtlich der Genotypen erhebliche Unterschiede aufwiesen. So trugen in der Therapiegruppe A acht Patienten den Genotyp 1a oder 1b und sieben Patienten den Genotyp 3a, während in Therapiegruppe B zehn Patienten den Genotyp 1a oder 1b trugen, aber nur drei Patienten Genotyp 2 oder 3a. Somit bestand ein Mißverhältnis zwischen den besser zu therapierenden Genotypen 2 und 3 im Vergleich zu den bisher wesentlich schlechter zu therapierenden Genotypen 1 und 4. Nichtsdestotrotz zeigten sich in Therapiegruppe B insgesamt bessere Therapieergebnisse als in Therapiegruppe A. Nur ein Patient von dreizehn wurde als Non Responder eingestuft, alle anderen Patienten der Therapiegruppe B sprachen auf die Therapie an und blieben auch in den Follow-Up-Untersuchungen HCV-RNA sowie HCV-Core-Ag negativ. Dies entspricht einer SVR-Rate von über 92%.

In der Therapiegruppe A wiesen vier von fünfzehn Patienten ein Non Response-Verhalten auf, bei einem weiteren Patienten kam es zu einem Breakthrough. Damit kam es also bei zehn von fünfzehn Patienten zu einer SVR, dies entspricht 66% und deckt sich damit mit der SVR-Rate großer Studien, bei denen ebenfalls dauerhafte Ansprechraten von 65-70% für die PEG-IFN- α /Ribavirin-Kombinationstherapie beschrieben wurden.

Auch das Response-Verhalten beider Therapiegruppen in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn offenbart signifikante Unterschiede. Wie Tabelle 2 zeigt, überwiegen in Therapiegruppe B die Initial Responder, während die Delayed Responder den Großteil der Patienten aus Therapiegruppe A stellen.

Anhand unserer Daten lässt sich unsere ursprüngliche Vermutung bestätigen, daß eine einmalige IFN- α -Gabe zu Beginn der Therapie zu einer Verbesserung des Therapieergebnisses führt. Insbesondere Patienten mit Genotyp 1a oder 1b, die insgesamt eine schlechtere Prognose bezüglich dauerhafter virologischer Ansprechraten zeigen, scheinen von dieser Interferon-Applikation zu profitieren. Selbstverständlich bedarf es weiterführender Untersuchungen mit größeren Fallzahlen um diesen Sachverhalt zu verifizieren, die Unterschiede im Hinblick auf das allgemeine und genotypenspezifische Ansprechen sind jedoch bereits in unserem Patientenkollektiv so eindeutig, daß von einer

Prognoseverbesserung für alle Patienten mit dem von uns eingeführten Therapieregime ausgegangen werden kann.

5.2. HCV-Core-Antigen: Diagnostische Alternative zur HCV-PCR?

Bisher wurde in der Behandlung der chronischen Hepatitis C zur Therapieüberwachung die quantitative HCV-PCR verwendet, welche sich durch hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet. Mit der quantitativen PCR ist es nicht nur möglich, geringe Virusmengen, sondern darüber hinaus auch Veränderungen der Viruslast mit ausreichender Genauigkeit nachzuweisen und damit frühzeitig einen Therapieerfolg zu beweisen.

Nachteil der HCV-PCR ist allerdings der Kostenfaktor, denn noch immer ist die PCR deutlich kostspieliger als Antigen- oder Antikörpernachweisverfahren. Daher gab es in den letzten Jahren vermehrt Bemühungen ein Nachweisverfahren für das HCV-Core-Antigen zu entwickeln, der in Sensitivität und Spezifität der HCV-PCR gleicht oder zumindest nahekommt und eben so wie diese eine Aussage über die jeweilige Veränderung der Viruslast zulässt.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß der Architekt® HCV-Core-Ag-Assay diese Anforderungen erfüllt. Bei insgesamt 406 untersuchten Proben war keine der HCV-Core-Ag negativen Proben in den hauseigenen Realtime-HCV-PCR positiv. Umgekehrt konnten jedoch 52 Proben HCV-RNA-negative Proben im Core-Ag-Assay als positiv gewertet werden. Ein Teil dieser Proben wurde auch in der diagnostischen Abteilung unseres Instituts mit einem kommerziell erworbenen Test untersucht und zeigte sich dort ebenfalls HCV-RNA-negativ. In der ersten HCV-Interferon-Studie unseres Instituts konnte gezeigt werden, daß die Eliminationshalbwertszeit des Core-Antigens um den Faktor 2,05 signifikant länger als die der HCV-RNA ist. Aus diesem Grund lässt sich das Core-Antigen bei vielen Patienten auch noch 48 Stunden nach Therapiebeginn nachweisen, obwohl die HCV-RNA schon nach acht oder zwölf Stunden unter der Nachweisgrenze lag.

Die längere Eliminationshalbwertszeit erklärt jedoch nicht, warum das Core-Antigen in einigen Fällen noch über mehrere Wochen persistiert und bei Patienten mit Breakthrough über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar bleibt.

Weiterhin wurde in der ersten HCV-Interferon-Studie unseres Instituts beobachtet, daß ein Großteil der Responder vor Behandlung einen deutlich kleineren HCV-RNA/HCV-Core-Ag-Quotienten als die Gruppe der Non Responder aufwies. Diese Beobachtungen konnten sich in unseren Untersuchungen nicht bestätigen, da sowohl Patienten mit initial hohen als auch mit niedrigen RNA/Core-Quotienten gute virologische Ansprechraten zeigten und unter den fünf Non Respondern sowohl hohe als auch niedrige RNA/Core-Quotienten beobachtet wurden.

Vielmehr zeigte sich in unseren Untersuchungen, daß nicht die Höhe des Quotienten vor Therapiebeginn, sondern vor allem dessen Veränderung unter IFN- α -Therapie für das virologische Response-Verhalten entscheidend ist. Sämtliche Patienten, die in den ersten 24 Stunden der Therapie eine deutliche Zunahme des Quotienten zeigten, also einen stärkeren Abfall des Core-Antigens als der HCV-RNA aufwiesen, zeichneten sich durch eine überaus rasche Elimination des Virus auf und waren allesamt nach 48 Stunden HCV-RNA und HCV-Core-Ag negativ. Demgegenüber stehen die fünf Non-Responder, welche allesamt in den ersten 24-48 Stunden nach Therapiebeginn keine wesentlichen Veränderungen des HCV-RNA/HCV-Core-Ag-Quotienten aufwiesen.

Die Ursachen für das Scheitern einer initial erfolgreichen IFN- α -Therapie sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird das Auftreten bzw. die Selektion Interferonresistenter HCV-Mutanten, „Downregulation“ des spezifischen zellulären Interferon-Rezeptors, und die Bildung von Antikörpern gegen IFN- α , die zu einer Abnahme bzw. Aufhebung der IFN- α -Wirkung führen. In einigen Studien konnte eine Assoziation zwischen einem Breakthrough und Auftreten von IFN- α -Antikörpern nachgewiesen werden (Roffi L. et al., 1995; Hoffmann RH et al., 1999). In weiterführenden Arbeiten konnte bewiesen werden, daß 29 % der Patienten unter IFN- α -Therapie Antikörper gegen rekombinantes IFN- α entwickeln, jedoch nur ein kleiner Teil dieser Patienten tatsächlich ein Breakthrough zeigte.

Für jene Patienten erscheint es daher sinnvoll, einen prädiktiven Marker zu finden, der frühzeitig erkennen lässt, ob mit einem Breakthrough zu rechnen ist. Um eine Korrelation zwischen dem Verlauf des Core-Antigens und dem Therapieverhalten zu beweisen, untersuchten wir die Serumproben aller Patienten sowie zusätzlich die Proben von

Patienten, die in vergangenen Studien unseres Instituts mit IFN- α oder PEG-IFN- α therapiert wurden.

Bei unseren Untersuchungen trat bei einem Patienten ein Breakthrough auf. Bei diesem Patienten zeigte sich ein deutlich von der Norm abweichender Verlauf des Core-Antigens. Während die Initial Responder und Delayed Responder mit Sustained Response einen kontinuierlichen Abfall des Core-Antigens bis unter die Nachweisgrenze zeigten, blieb der Patient mit Breakthrough über den gesamten Untersuchungszeitraum Core-Ag-positiv.

Eine solche Persistenz des Core-Antigens bei Patienten mit initial positivem virologischen Ansprechen und späterem Breakthrough oder Relapse ist bisher in dieser Form noch nicht beobachtet worden. Zwar gibt es seit einiger Zeit die Vermutung, daß das Core-Antigen durch immunsuppressive Wirkung zur Chronifizierung der Krankheit führt und das Therapieversagen einer IFN- α -Therapie maßgeblich beeinflusst, jedoch konnte dies bisher nicht beweisend dargelegt werden.

Unsere Daten zeigen eine eindeutige Korrelation zwischen Kinetik des Core-Antigens und dem Response-Verhalten der Patienten. Eine unzureichende Abnahme des Core-Antigens scheint ein Versagen der IFN-Therapie schon frühzeitig anzuzeigen. Gestützt wird diese Beobachtung durch die Zunahme des Quotienten aus HCV-RNA und HCV-Core-Ag. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Variationen des Quotienten dieser beiden Parameter im Verlauf einer chronischen HCV-Infektion auftritt (ZANETTI AR et al, 2003) und es wurde postuliert, dass eine Verschiebung des Quotienten prognostische Aussagekraft bezüglich der Krankheitsaktivität hat (LARGE MK et al, 1999; CARABAICH A et al, 2005). Wir konnten feststellen, daß eine Zunahme dieses Quotienten in den ersten 48 Stunden der Therapie mit einer raschen und anhaltenden Viruselimination assoziiert war, während ein gleichbleibender oder fallender Quotient vor allem bei Non Respondern und Patienten mit Breakthrough zu beobachten war.

Dies stützt den Verdacht, daß dem Core-Ag eine zentrale Rolle bei Therapieversagen unter IFN-Therapie zukommt. Anscheinend gelingt es dem Virus unter bestimmten Voraussetzungen, durch Einfluß des Core-Antigens einer durch Interferon induzierten suffizienten Immunantwort des Patienten zu entgehen. Es wurde in diesem Zusammenhang postuliert, dass eine Zunahme des Quotienten aus HCV-RNA und HCV-Core-Ag durch die

Präsenz inkompletter, defekter Viruspartikel bedingt ist, welche letztlich Indiz für eine schnellere Viruselimination sein könnten (FERAY C et al., 2003).

Für die Praxis entscheidend ist ein Parameter, der frühzeitig eine Aussage über das individuelle Response-Verhalten eines Patienten zulässt.

Sicherlich erscheint es momentan verfrüht, anhand unserer Datenlage das Core-Antigen als prognostischen Faktor einer Interferon-Therapie der HCV-RNA gleichzusetzen. Zur Verifizierung der Daten bedarf es zunächst noch größerer Fallzahlen. Allerdings kann man davon ausgehen, daß in Zukunft das Core-Ag eine entscheidende Rolle in der prätherapeutischen und therapeutischen Phase könnte, da es aufgrund hoffentlich niedriger Kosten, vergleichbarer Sensitivität und Spezifität der HCV-RNA-PCR ebenbürtig ist und darüber hinaus Informationen über die Krankheitsentwicklung zu liefern scheint, die bei alleiniger Beurteilung der HCV-RNA nicht verfügbar sind.

5.3. HCV-RNA und α -GST als Marker der spezifischen IFN-Response

Im Bezug auf das Therapieverhalten der verschiedenen HCV-Genotypen und dem individuellen Response-Verhalten einzelner Patienten sind noch viele Fragen ungeklärt. Insbesondere die Frage, warum es bei bestimmte Patienten nicht gelingt, mittels IFN- α -Therapie das HCV zu eliminieren ist dabei von Interesse. Bisher wurden lediglich prognostisch günstige und ungünstige Faktoren beschrieben. Als günstige Faktoren hinsichtlich eines positiven Ansprechens auf IFN- α wurden dabei unter anderem folgende Faktoren genannt (Berg, T, Hopf U, 2001):

1. niedriges Alter
2. weibliches Geschlecht
3. geringer Fibrosegrad der Leber
4. deutlich erhöhte Transaminasen
5. niedriges Ferritin
6. Genotyp 2 oder 3
7. niedriges HCV-RNA-Konzentration vor Therapiebeginn
8. geringe Heterogenität der Viruspopulation

Bei allen diesen Punkten handelt es sich jedoch um rein deskriptive Faktoren, welche einer gewissen statistischen Schwankungsbreite unterliegen und nicht mit Bestimmtheit dem Therapieansprechen zugeordnet werden können. Die größte Verlässlichkeit bietet insgesamt noch das Vorliegen eines Genotyps 2 oder 3, welche eine Therapieerfolgsquote von etwa 80% versprechen. Alle übrigen Faktoren sind deutlich weniger verlässlich. Einige Studien negieren sogar sämtliche Prognosemarker mit Ausnahme des Genotyps (Xie Y et al., 2005).

In unseren Untersuchungen sollte es unter anderem darum gehen, bestimmte Prognosefaktoren zu überprüfen und darüber hinaus nach Faktoren zu suchen, die eine zuverlässigere Aussage hinsichtlich des Response-Verhaltens zulassen.

Als einen potentiellen prognostischen Faktor untersuchten wir den entzündlichen Aktivitätsgrad der Leber jedes Patienten. Hierzu gab es in der Vergangenheit widersprüchliche Aussagen hinsichtlich der Prognose. Einerseits wurden erhöhte Transaminasen mit einem besseren Ansprechen auf eine Interferon-Therapie in Zusammenhang gebracht. Hintergrund dieser Vermutung war die Überlegung, daß es durch eine stärkere entzündliche Aktivität zu einer besseren Immunantwort gegen das Virus und somit zu einer schnelleren Elimination kommt. Andererseits beobachtete man allerdings, daß die Ansprechrate von Patienten mit chronischer Hepatitis C und normalen Transaminasen gleich hoch ist wie von Patienten mit erhöhten Transaminasen

Wir verwendeten als Marker des Leberzellzerfalls statt der Transaminasen die α -Gluthation-S-Transferase, welche zum einen leberzellspezifisch ist und zum anderen durch ihre kurze Halbwertszeit eine exakte Beurteilung des Leberzellzerfalls im Stundenbereich ermöglicht. Dabei konnten wir zeigen, daß es bei hohen α -GST-Werten vor Therapiebeginn stets zu einer sehr raschen Viruselimination kam. Des Weiteren fiel auf, daß Patienten, welche einen signifikanten Anstieg der α -GST unter Therapie entwickelten, ebenfalls sehr schnell das Hepatitis-C-Virus eliminierten.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der ersten HCV-Interferon-Studie unseres Instituts und unserer Vermutung, daß sich ein hoher entzündlicher Aktivitätsgrad vor Therapiebeginn positiv auf die Viruselimination auswirkt.

Weiterhin von Bedeutung für die Therapieprognose ist die Entwicklung der α -GST in den ersten 48 Stunden. Alle Responder zeigen, in Abhängigkeit ihrer Therapiegruppe, eine signifikante Erhöhung der α -GST-Konzentration um mindestens 10 ng/ml unter Interferon-Therapie. In Therapiegruppe A lag dieser GST-Anstieg im Mittel zwischen der zwölften bis achtundvierzigste Stunden, in Therapiegruppe B zwischen zweiter und achter Stunde, also jeweils nach dem Anfluten des jeweiligen Interferons. Bei den Non-Respondern blieb dieser Anstieg der α -GST jedoch aus. Genau in diesem Punkt unterscheiden sich also Responder elementar von den Non-Respondern. Alle Response-Typen zeigen unter IFN- α -Therapie eine nachweisbare Abnahme der HCV-Viruslast auf. Unterschied dabei ist lediglich der mittlere Abfall der HCV-RNA, der bei den Non-Respondern im Schnitt deutlich geringer ausfällt als bei Delayed Respondern und Initial Respondern. Unsere Daten zeigen jedoch, daß zum Zeitpunkt des stärksten Abfalls der HCV-RNA ein Anstieg der α -GST einen zuverlässigen Marker für das weitere Therapieverhalten darstellt. Blieb dieser Anstieg aus, blieben die Patienten auch in der Folge HCV-RNA-positiv. Um diese Beobachtungen zu stützen, untersuchten wir auch die HCV-RNA und α -GST jener Patienten, die in vorangegangenen Studien unseres Instituts integriert waren und fanden dabei analoge Ergebnisse. Anhand dieser Daten lässt sich der Schluß ziehen, daß ein Abfall der HCV-RNA um weniger als 2,5 log-Stufen sowie ein fehlender Anstieg der α -GST-Serumkonzentration um mindestens 10 ng/ml als zuverlässiger prädiktiver Marker hinsichtlich eines negativen Therapieverhaltens auf eine IFN- α -Therapie zu betrachten ist.

5.4. TTV: Bedeutung der Koinfektion und Therapie-Response

Diverse Arbeitsgruppen beschäftigten sich in der Vergangenheit mit der Bedeutung einer Koinfektion mit dem Torqueno-Teno-Virus (TTV) für den Krankheitsverlauf und das Therapieverhalten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. Sie stellten fest, daß zwischen

dem spezifischen Ansprechen des HCV auf eine IFN- α -Therapie und dem Vorliegen einer Infektion mit dem TT-Virus und der Höhe der TT-Viruslast keine Korrelation besteht (Kawanaka M et al., 2002; Yamada T et al., 2002).

Gleiches konnten wir auch bei unseren Untersuchungen bestätigen. Von insgesamt 30 Patienten waren 18 Patienten zu Therapiebeginn TTV-positiv. Unter diesen 18 TTV-positiven Patienten gab es im weiteren Verlauf keinen Zusammenhang zwischen dem TTV-Infektionsstatus, dem Ansprechen des TTV auf Interferon und dem Response-Verhalten des HCV.

In weiteren Untersuchungen konnten wir demonstrieren, daß das TT-Virus ebenfalls auf IFN- α reagiert. Von 18 TTV-positiven Patienten waren nach Therapieende nur noch vier Patienten TTV-positiv, dies entspricht einer Response-Rate von 78%. Im Gegensatz zum HCV besteht jedoch beim TT-Virus kein Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen. Auch lässt sich anhand der Kinetik der ersten 48 Stunden kein zum HCV analoges Response-Muster herausarbeiten. Sicher scheint jedoch zu sein, daß das TT-Virus im hohen Prozentsatz Interferon-sensibel reagiert. Dies konnte bislang nur in einer einzigen Studie mit sehr kleinen Patientenzahlen gezeigt werden (Moreno J et al., 2004)

Der Stellenwert dieser Information erscheint zum jetzigen Zeitpunkt klinisch als weniger bedeutsam, da bisher keine Assoziation von Erkrankungen mit dem TT-Virus gefunden werden konnten. Auch als Koinfektion mit hepatotropen Viren ist bislang keine schädigende Wirkung des TTV ersichtlich. Daher besteht derzeit keine Indikation zum Nachweis einer Infektion mit dem TT-Virus und im positiven Fall keine Indikation zur Therapie.

6. Zusammenfassung

Durch die Einführung von Interferonen bei der Therapie der chronischen HCV-Infektion konnte die Prognose der Patienten deutlich verbessert und ein signifikanter Anstieg der anhaltenden Viruselimination gegenüber einer spontanen Ausheilung erreicht werden. Eine weitere Verbesserung des Therapieerfolgs wurde durch die Kombinationstherapie mit Ribavirin und die Entwicklung pegylierter Interferone erreicht. Jedoch stellen vor allem die Genotypen 1 und 4 ein großes therapeutisches Problem dar, da die Rate der anhaltenden Viruselimination hier noch immer unter 50% liegt. Ein möglicherweise wichtiges Problem der pegylierten Interferone stellt die wesentlich langsamere Anflutungszeit dar. Dadurch sind vor allem in den ersten Stunden nach Therapieeinleitung die Serumspiegel von Peg-IFN sehr niedrig. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt einer zusätzlichen einmaligen Applikation von unpegylierten IFN- α zur Standardkombinationstherapie aus PEG-IFN- α und Ribavirin zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach zusätzlicher Gabe von unpegylierten IFN- α zu einem signifikant schnellerem Abfall der Viruslast bereits in den ersten 12 Stunden nach Therapiebeginn kommt. Diese frühe Viruselimination ist ein wichtiger prognostischer Faktor für das Therapieansprechen. Dementsprechend konnte die Zahl der Non-Responder in dieser Behandlungsgruppe signifikant reduziert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung weiterer Marker, die eine prognostische Aussage auf das Therapieansprechen bereits in den ersten Stunden nach Therapiebeginn ermöglichen. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der α -GST als spezifischer Indikator einer hepatozellulären Schädigung in den ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn eine zuverlässige Aussage über den Therapieerfolg zulässt. Ein Anstieg der α -GST in den ersten Stunden nach Therapiebeginn korrelierte mit einer vollständigen Viruselimination. Bei den Non-Respondern blieb dieser Anstieg der α -GST aus.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dem Quotienten aus HCV-RNA und HCV-Core-Ag entscheidende prognostische Aussagekraft für ein Therapieversagen zukommt. Eine unzureichende Abnahme des Core-Antigens zeigt ein Therapieversagen frühzeitig an. Wir

konnten feststellen, daß eine Zunahme des Quotienten aus HCV-RNA und HCV-Core-Ag in den ersten 48 Stunden der Therapie mit einer raschen und anhaltenden Viruselimination assoziiert war, während ein gleichbleibender oder fallender Quotient vor allem bei Non Respondern und Patienten mit Breakthrough zu beobachten war.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer HCV-Core-Antigen-Assay getestet und im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität und prognostischer Aussage mit der bislang verwendeten HCV-PCR verglichen. Wir konnten zeigen, dass die Bestimmung des HCV-Core-Ag im Hinblick auf die diagnostische Aussagekraft und Verlässlichkeit mit der HCV-PCR vergleichbar ist und darüber hinaus entscheidende prognostische Aussagekraft besitzt. Dementsprechend könnte der Bestimmung des HCV-Core-Ag in Zukunft bei Diagnostik und Therapiemonitoring der chronischen HCV-Infektion eine wichtige Rolle zukommen.

Summary

The introduction of interferon for the therapy of patients with chronic hepatitis C infection led to a markedly improved prognosis and improved sustained virological response. Pegylated interferon- α and combination therapy with ribavirin resulted in a further improvement of therapeutic results. However, the genotypes 1 and 4 of HCV still pose a problem with sustained response rates under 50 %. The central problem of pegylated-IFN is that it does not reach rapidly high peak concentration in serum, especially in the early hours after therapy initiation. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of an additional application of non-conjugated interferon- α to the current standard therapy of chronic hepatitis C infection.

It could be shown that the additional application of unpegylated IFN- α led to a significant improved virological response in the first 12 hours after initiation of therapy. This early virus elimination is a decisive prognostic factor for the therapy response. Accordingly, the rate on nonresponders was significantly smaller in this treatment group.

A further goal of the present study was to establish further prognostic markers for the response to treatment in the first hours after therapy initiation. Our results show that within the first 48 hours after therapy initiation, kinetics of α -GST can predict the virological response. Thereby, increased serum levels of α -GST in the first hours after IFN application

correlated with a sustained virological response. In contrast, nonresponders did not reveal such an increase of α -GST serum levels. Furthermore, we were able to show that the ratio between HCV-RNA and HCV-core antigen has a particular prognostic value for the virological response. We could show that an increasing ratio of HCV-RNA and HCV-core antigen in the first 48 hours of therapy was associated with a sustained virological response, while a constant or decreasing ratio was observed especially in non responders and a patient with breakthrough.

Furthermore, a new HCV-core antigen assay was tested in the present work and was compared to standard HCV-PCR. We could show that the measurement of the HCV-core antigen is comparable to the currently used standard HCV-PCR in terms of sensitivity, specificity and prognostic value and furthermore provides additional prognostic value. Therefore, the measurement of HCV-core antigen might have an important impact in future diagnosis and therapy monitoring of chronic HCV treatment.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

Alberti A, Noventa F, Benvegna L, Boccato S, Gatta A. Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2002; 137:961-964

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H: Transmissible agent in non-A/non-B hepatitis. *Lancet* 1978 Mar 4;1 (8062): 459-63

Alter HJ: New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 15 (1992) 350-353

Alter MJ: Hepatitis C virus infection in the United States. *J Hepatol* 1999, 31 Suppl 1, 88-91

Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S: Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999 Jun; 37 (6): 1802-8

Berg T, Schuff-Werner P, Hopf U. Sustained remission of chronic hepatitis C after changing to human leucocyte interferon alfa (IFNa) in a difficult-to-treat patient with breakthrough phenomenon associated with antibodies against recombinant IFNa. *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 612-614.

Berg T, Hopf U: Therapie der Hepatitis-C-Virusinfektion S.246, in: Häussinger D und Niederau C (eds.): *Hepatitis C*; Berlin; Wien [u.a.] Blackwell Wissenschaftsverlag. 2001

Boyer N, Marcellin P: Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32 (1 Suppl): 98-112

Brillanti S, Garson J, Foli M, Whitby K, Deaville R, Masci C, Miglioli M, Barbara L: A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994, 107: 812-817

Bruns J. 2003. Reaktivierungskinetik von Polyomavirus BK, Torque Teno Virus und Cytomegalovirus sowie Varianten der regulatorischen Region des Polyomavirus BK bei Nierentransplantierten. Doktorarbeit. Justus Liebig-Universität, Fachbereich Medizin.

Carabaich A, Ruvoletto M, Bernardinello E, Tono N, Cavalletto L, Chemello L, Gatta A, Pontisso P. Profiles of HCV core protein and viremia in chronic hepatitis C: possible protective role of core antigen in liver damage. *J Med Virol.* 2005 May;76(1):55-60.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A,non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989 Apr 21; 22 (4902) 359-62

Courouce AM, Bouchardeau F, Girault A, Le Marrec N: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 343 (1994) 477-478

Debono E, Halfon P, Bourliere M: Absence of hepatitis C genome in semen of infected men by polymerase chain reaction, branched DNA and in situ hybridization. *Liver* 20 (2000) 257-261

Deltenre P, Canva V, El Nady M, François C, Castelain S, Dharancy S, Louvet A, Bocket L, Lazrek M, Hollebecque A, Wartel F, Henrion J, Duverlie G, Mathurin P. A 2-log drop in viral load at 1 month is the best predictor of sustained response in HCV patients with normal ALT: a kinetic prospective study. *J Viral Hepat.* 2009 Jul;16(7):500-5. Epub 2009 May 8.

De Mitri MS, Mele L, Morsica G, Chen CH, Sitia G, Gramenzi A, Andreone P, Alberti A, Bernardi M, Pisi E: Effect of increasing dose of interferon on the evolution of hepatitis C virus 1b quasispecies. *J Med Virol* 2000 Feb; 60 (2): 133-8

Diepolder HM, Hoffmann RM, Gerlach JT, Zachoval R, Jung MC, Pape GR. Immunopathogenesis of HCV infection. In H. W. Reesink, Editor; *Hepatitis C Virus*, 2nd Edition 1998; 135.

Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT, Lindsay KL, Everhart JE, Wright EC, Lee WM, Lok AS, Bonkovsky HL, Morgan TR, Ghany MG, Morishima C, Snow KK, Dienstag JL; HALT-C Trial Investigators. Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N Engl J Med*. 2008 Dec 4;359(23):2429-41.

Di Domenico C, Di Giacomo C, Marinucci G, Di Paolo A. Vertical transmission of HCV infection: prospective study in infants born to HIV-1 seronegative women. *Ig Sanita Pubbl*. 2006 Mar-Apr;62(2):129-42.

EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. *European Association for the study of the Liver, J hepatol* 1999, 30:956-961

El-Serag HB: Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1): 74-83.

Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH: A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A,non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325 (1991) 98-104

Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ: The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000, 288: 339-344

Feray C, Berthillon P, Ducolombier D, Maynard M, Codes L, Gigou M, Bizollon T, Samuel D, Trepo C. 2003. The HCV core Ag/HCV RNA ratio predicts the course of HCV replication in treated and untreated liver transplanted patients. *Hepatology* 38:468A.

François C, Castelain S, Duverlie G, Capron D, Nguyen-Khac E. Optimizing the treatment of chronic viral hepatitis C. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Dec;3(6):607-13.

Fried MW, Shindo M, Fong TL: Absence of hepatitis viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 102 (1992) 1306-1308

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975–982 (Ib)

Fried MW. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl): 237-244

Giannini C, Bréchet C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10 Suppl 1:S27-38.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan T et al. PEGASYS International Study Group. Peginterferon alfa 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140 (5): 346–355 (Ib)

Han JH, Shyamala V, Richmann KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo Q-L, Houghton M. Characterisation of the terminal regions of hepatitis C

viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl Acad Sci* 1991 ; 88 : 1711-1715 .

Hanafusa T, Ichikawa Y, Kyo M. Long term impact of hepatitis virus infection on kidney transplant recipients and a pilot study of the effects on interferon-alpha on chronic hepatitis C. *Transplant Proc* 1995; 27: 956-957.

Heathcote EJ, Shiffmann ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffmann J, De Pamphilis J. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1673-1680

Hofmann WP, Polta A, Herrmann E, Mihm U, Kronenberger B, Sonntag T, Lohmann V, Schönberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):921-30. Epub 2006 Dec 3.

Hoffmann RH, Berg T, Teuber G, Leifeld L, Prümmer O, Jung MC, Spengler U, Zeuzem S, Hopf U, Pape GR. Interferon antibodies and the breakthrough phenomenon during ribavirin-interferon-combination therapy and interferon-monotherapy of patients with chronic hepatitis C. *Z. Gastroenterol* 1999, 37: 715-723.

Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA, Holland JJ, eds. Genetic Diversity of RNA Viruses. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992; RNA virus populations as quasispecies. p. 1-20

Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1): 21-29

Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, Jones DB, Ristgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, Park Y, Meschivitz C, Jones EA: Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha-interferon: a preliminary report. *N Engl J Med* 1986, 315: 1575

Hwang LY, Ross MW, Zack C, Bull L, Rickman K, Holleman M. Prevalence of sexually transmitted infections and associated risk factors among populations of drug abusers. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct;31(4):920-6. Epub 2000 Oct 25.

Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*. 2008;4:77–85.

Idrees M, Riazuddin S. A study of best positive predictors for sustained virologic response to interferon alpha plus ribavirin therapy in naive chronic hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol*. 2009 Jan 20;9:5.

Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandão-Mello CE, Reddy KR, Craxi A, Martin AO, Teuber G, Messinger D, Thommes JA, Tietz A. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha 2b: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2009 Apr 21;150(8):528-40.

Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M: Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ* 1999, 77: 801-807

Kawanaka M, Niiyama G, Mahmood S, Ifukube S, Yoshida N, Onishi H, Hanado S, Ito T, Yamada G; Effect of TT virus co-infection on interferon response in chronic hepatitis C patients. *Liver*. 2002 Aug;22(4):351-5.

Keating G, Curran M. Peginterferon-alpha-2 a (40kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs* 2003; 63: 701–730 (Übersicht)

Kronenberger B, Zeuzem S. Current and future treatment options for HCV. *Ann Hepatol*. 2009 Apr-Jun;8(2):103-12.

Kurauchi O, Kurui T, Itakura A, et al.: Studies on transmission of hepatitis C virus from mother to child in the perinatal period. *Arch Gynecol Obstet* 253 (1993) 121-126

Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N. A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis. *Hepatol Res.* 2010 Mar 1;40(3):251-60. Epub 2010 Jan 11.

Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. 1999. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: Possible implication for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 9:1215–1219.

Lo SY, Selby MJ, Ou JH: Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* 1996 Aug; 70 (8): 5177-82

Manns MP, Rambusch EG: Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl1): 39-42

Manns MP, McHutchison JG, Gordon S, Rustgi V, Shiffmann ML, Lee WM, Ling ML, Cort S, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared to interferon alfa-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C: 24 week treatment analysis of a multicenter, multinational phase III randomized controlled trial. *Hepatology* 2000; 32 (No.4 Pt 2): 297

Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 9-16.

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J: Hepatitis C virus circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992 May; 66 (5): 3225-9

Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K: Hepatitis C virus core Protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999 Jun; 73 (6): 4713-20

Matsumoto M, Hwang SB, Jend KS, Zhu N, Lai MM: Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996 Apr 1; 218 (1): 43-51

Matsuura K, Tanaka Y, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Kurbanov F, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Abbott RealTime hepatitis C virus (HCV) and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV assays for prediction of sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):385-9. Epub 2008 Dec 17.

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZG, Ling MH, Albrecht JK for the Hepatitis Interventional Therapy Group (HIT). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485.

McHutchison JG, Davis GL, Esteban-Mur R et al. Durability of sustained virologic response in patients with chronic hepatitis C after treatment with interferon α -2b alone or in combination with ribavirin. *Hepatology* 2001; 34 (Suppl.): 244A (IIa)

Miyazari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007 Sep;9(9):1089-97. Epub 2007 Aug 26.

Mondelli MU, Silini E: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 65-70.

Monto A, Wright TL: The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001, 28:441-449

Moreno J, Moraleda G, Barcena R, Mateos M, del Campo S; Response of TT virus to IFN plus ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004 January 1;10(1):143-146

Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998 Sep; 4 (9): 1065-7

Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3177-3182.

Nagayama K, Kurosaki M, Enomoto N, Miyasaka Y, Marumo F, Sato C: Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression. *Hepatology* 2000 Mar; 31 (3): 745-50

Netski DM, Mosbrugger T, Depla E, Maertens G, Ray SC, Hamilton RG, Roundtree S, Thomas DL, McKeating J, Cox A. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):667-75. Epub 2005 Jul 22.

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 1998; 282: 103.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:92-97.

Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 1999; 73: 9604-9608.

Nübling CM, Unkelbach U, Chudy M, Seitz R. Effect of viral nucleic acid testing on contamination frequency of manufacturing plasma pools. *Transfusion*. 2008 May;48(5):822-6. Epub 2008 Jan 15.

Nübling CM, Heiden M, Chudy M, Kress J, Seitz R, Keller-Stanislawski B, Funk MB. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion*. 2009 Sep;49(9):1850-8. Epub 2009 May 14.

Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanism of action of ribavirin. *Rev Infect Dis* 1990, 12: 1139-1146

Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*. 2007;449:919–22.

Pujol FH, Devesa M. Genotypic variability of hepatitis viruses associated with chronic infection and the development of hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Aug;39(7):611-8.

Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000 ; 242 : 55-84 .

Regan FA, Hewitt P, Barbara JA, Contreras M: Prospective investigation of transfusion-transmitted infection in recipients of over 20000 units of blood. TTI Study Group. *Bmj* 320 (2000) 403-406

Reichard O, Norkrans G, Fryden A, Braconier JH, Sonnerborg A, Weiland O: Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish Study Group, *Lancet* 1998, 351: 83-87

Roberts EA, Yeung L: Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1); 106-113

Robert Koch-Institut (Hrsg) (2003) *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002*, Berlin S: 75–87

Roffi L, Mels GC, Antonelli G, et al. Breakthrough during recombinant interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: prevalence, etiology, and management. *Hepatology* 1995;21:645-49.

Ross RS, Viazov S, Renzing-Kohler K, Roggendorf M: Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J Med Virol* 2000, 60; 122-125

Roth WK, Lee J-H, Ruster B, Zeuzem S: Comparison of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript. *Anal Biochem* 224 (1995) 597-600

Russo MW, Fried MW. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 1711-1719

Sakuma I, Enomoto N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C: Selection of hepatitis C virus quasispecies during interferon treatment. *Arch Virol* 1996; 141 (10): 1921-32

Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, Heim MH. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 13;105(19):7034-9. Epub 2008 May 8.

Schiffmann ML, Packros PJ, Reddy RK, Wright TL, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP, Everson G, Pedder S: A controlled randomized, multicenter, descending dose phase II trial of pegylated interferon alfa 2A vs standard interferon alfa 2A for treatment of chronic hepatitis C [Abstract] *Gastroenterology* 1999; 116: 1275A

Schuettler CG, Thomas C, Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S: Variable ratio of hepatitis C virus RNA to viral core antigen in patients sera, *J Clin Microbiol*, 2004, 1977-1981

Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res*. 2010 Jan;131:17-34.

Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Nishioka M, Ikeda K, Takahashi H, Enomoto N, Saito T, Major ME, Nakazawa T, Akatsuka T, Feinstone SM, Berzofsky JA: T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 1999 Jan 1; 162 (1): 568-76

Sidwell RW, Huffmann JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK: Broad spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta_D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972, 177: 705-706.

Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC: Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 5): 1053-61

Soza A, Everhart JE, Ghany MG, Doo E, Heller T, Promrat K, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Neutropenia during combination therapy of interferon alfa and ribavirin for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 1273-1279

Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silvermann RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227

Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, April M, Barker LF, Pineda-Tamodong G: Transmission of non-A-/non-B- hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1978 Mar 4;1 (8062) 463-66

Thomas C: 2003. Die frühe Kinetik der Hepatitis-C-Virämie als prognostischer Marker einer Interferon-Therapie. Doktorarbeit Justus Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Medizin

Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology*. 1997;112:1017-21.

Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM: Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003, 37: 1189-1198

Van der Poel CL, Cuyper HTM, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R, van Bonven JJP, Winkel I, Mulder-Folkerts D, Exel-Oehlers PJ, Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Polito A, Houghton M, Lelie PN: Confirmation of hepatitis C virus infection by new-four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337 (1991) 317-319

Van Regenmorthel MHV, Fauquet CM, Bishop CM, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Hrsg.): Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, London Academic Press, 2000

Vernelen K, Claeys H, Verhaert H, Volckaerts A, Vermeylen C: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 343 (1994) 853

Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B: Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002, 169:3447-3458.

Woodfield DG, Harness M, Rix-Trott K: Hepatitis C virus infection in oral and injectable drug users. *N Z Med J* 1993, 106:332-334

Xie Y, Xu DZ, Lu ZM, Luo KX, Jia JD, Wang YM, Zhao GZ, Zhang SL, Zhang DZ: Predictive factors for sustained response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C: a randomized, open, and multi-center controlled trial. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005 May;4(2):213-9.

Yamada T, Naitou H, Morita T; Influence of TT virus co-infection on IFN-beta therapy in patients with chronic hepatitis C. *Kansenshogaku Zasshi.* 2002 Sep;76(9):747-53.

Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz. JH, Ludwig J, Ukuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334.

Zanetti AR, Romano` L, Brunetto M, Colombo M, Bellati G, Tackney C. 2003. Total HCV core antigen assay: A new marker of hepatitis C viremia for monitoring the progress of therapy. *J Med Virol* 70: 27–30.

Zdilar D, Franco-Bronson K, Buchler N, Locala JA, Younossi ZM. Hepatitis C, Interferon alfa and depression. *Hepatology* 2000; 31: 1207-1211

Zeuzem S und Roth WK: Diagnostik der HCV-Infektion, in: Häussinger D und Niederau C (eds.): *Hepatitis C*; Berlin; Wien Blackwell Wissenschaftsverlag 2001

Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai, MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffmann J, Brunda MJ. Peg-Interferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343: 1666-1672

Zeuzem S; *Hepatitis C im Dialog*; Georg Thieme Verlag; Stuttgart; New York, 2004

Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Hueppe D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2009 Feb;16(2):75-90. Epub 2008 Aug 28.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
as	antisense
AST	Aspartataminotransferase
BVDV	Bovines Virus-Diarrhö Virus
cDNA	komplementäre DNA
d	Tag
Da	Dalton
DEPC	Pyrokohlensäurediethylester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR	Delayed Responder
Ds-DNA	Doppelstrang-DNA
EASL	European Association for the Study of the Liver
ebd.	ebenda
EDTA	Ethylendiamintrisessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GOT	Glutamatoxalacetattransferase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom

HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HVR	hochvariable Region
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IR	Initial Responder
IU	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LED	light-emitting diode
m	milli
NANB	Non-A-Non-B
NCR	nichtcodierende Region
NIH	National Institute of Health
NK	natürliche Killerzellen
NR	Non Responder
NS	Nichtstrukturprotein
ORF	open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG-IFN	pegyliertes Interferon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	sense
SEM	standard error of mean
s.o.	siehe oben
SR	Sustained response
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur

Tris
WHO

Trisaminomethan
World Health Organization

7.3. Publikationsverzeichnis

1. Troidl C, Möllmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, **Szardien S**, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, Elsässer A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3485-96. Epub 2009 Feb 17.
2. Möllmann H, Nef HM, Voss S, Troidl C, Willmer M, **Szardien S**, Rolf A, Klement M, Voswinckel R, Kostin S, Ghofrani HA, Hamm CW, Elsässer A. Stem cell-mediated natural tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2011 Jan;15(1):52-62.
3. Troidl C, Nef H, Voss S, Schilp A, Kostin S, Troidl K, **Szardien S**, Rolf A, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Hamm CW, Elsässer A, Möllmann H. Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jul;49(1):142-51. Epub 2010 Apr 2.
4. **Szardien S**, Möllmann H, Voss S, Troidl C, Rolf A, Liebetrau C, Rixe J, Elsässer A, Hamm CW, Nef HM. Elevated serum levels of neuropeptide Y in stress cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2011 Feb 17;147(1):155-7. Epub 2010 Jun 16.
5. **Szardien S**, Nef HM, Möllmann H, Voss S, Troidl C, Liebetrau C, Rolf A, Rixe J, Weber M, Hamm CW. Transient elevation of NT-pro-BNP as a predictor for myocardial ischemia. *Clin Res Cardiol.* 2010 Dec;99(12):857-9. Epub 2010 Sep 7.
6. Liebetrau C, **Szardien S**, Rixe J, Woelken M, Rolf A, Bauer T, Nef H, Möllmann H, Hamm C, Weber M. Direct admission versus transfer of AMI patients for primary PCI. *Clin Res Cardiol.* 2011 Mar;100(3):217-25. Epub 2010 Sep 21.
7. **Szardien S**, Möllmann H, Elsässer A, Hamm CW, Nef HM. Historische und gegenwärtige pathophysiologische Konzepte der Tako-Tsubo-Kardiomyopathie. *Herz.* 2010;35(4):258 / 266

8. **Szardien S**, Möllmann H, Liebetrau C, Elsässer J, Rixe J, Rolf A, Nef HM, Weber M, Hamm CW. Clinical Outcome of Patients Treated with an Early Invasive Strategy after Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *J Int Med Res.* 2011;39(6):2169-77

9. Szardien S, Nef HM, Voss S, Troidl C, Liebetrau C, Hoffmann J, Rauch M, Mayer K, Kimmich K, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kojonazarov B, Schermuly RT, Kostin S, Elsässer A, Hamm CW, Möllmann H. Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1 β synthesis. *Eur Heart J.* 2012 Mar;33(5):595-605.

10. Szardien S, Nef HM, Troidl C, Willmer M, Voss S, Liebetrau C, Hoffmann J, Rolf A, Rixe J, Elsässer A, Hamm CW, Möllmann H. Bone marrow-derived cells contribute to cell turnover in aging murine hearts. *Int J Mol Med.* 2012 Aug;30(2):283-7.

7.4. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Bad Nauheim, 11.10.2011

7.5. Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. phil. nat. Wolfram Gerlich für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertationsarbeit, für seinen außerordentlichen Einsatz bei der wissenschaftlichen Betreuung und die permanente Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Christian G. Schüttler für die intensive und herzliche Unterstützung des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit. Sein analytisches Denken und Forschergeist haben mein Interesse für die Grundlagenforschung geweckt.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Lohmeyer, Herrn Dr. med. Discher und Herrn Dr. med. Friese sowie allen ärztlichen und pflegerischen Mitarbeitern der Infektionsstation des Universitätsklinikums Gießen für die Zusammenstellung der Serensammlung für diese Arbeit.

Von ganzen Herzen danken möchte ich meinen Eltern, die meine schulische, universitäre und berufliche Laufbahn in einzigartiger Weise unterstützt und diese Promotionsarbeit sowohl in finanzieller Form als auch durch ihre stete Hilfsbereitschaft ermöglicht haben.

Ein tiefer Dank gilt meiner Frau Patrizia, die mir seit vielen Jahren als aufopferungsvolle Partnerin in guten wie in schlechten Zeiten zur Seite steht.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**