

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Klinik für Innere Medizin I / Gastroenterologie und Hepatologie

Direktor Prof. Dr. med. W. F. Caspary

**Mutationen innerhalb des strukturellen E2- und des
nicht strukturellen NS5A-Proteins des Hepatitis C-
Virus und Korrelation mit dem Ansprechen auf
eine antivirale Therapie bei Patienten mit einer
Hepatitis C-Genotyp-3a-Infektion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des
Fachbereiches Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Ilka Kornetzky

aus Radeberg

Frankfurt am Main 2005

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Klinik für Innere Medizin I / Gastroenterologie und Hepatologie

Direktor Prof. Dr. med. W. F. Caspary

**Mutationen innerhalb des strukturellen E2- und des
nicht strukturellen NS5A-Proteins des Hepatitis C-
Virus und Korrelation mit dem Ansprechen auf
eine antivirale Therapie bei Patienten mit einer
Hepatitis C-Genotyp-3a-Infektion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des
Fachbereiches Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Ilka Kornetzky

aus Radeberg

Frankfurt am Main 2005

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: PD Dr. C. Sarrazin
Korreferent: Prof. Dr. H. W. Doerr
Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| ABKÜRZUNGEN, ABBILDUNGEN UND TABELLEN | 7 |
| 1. EINLEITUNG | 10 |
| 1.1. Entdeckung des Hepatitis C-Virus | 10 |
| 1.2. Genotypen/Variabilität | 10 |
| 1.3. Übertragung des Hepatitis C-Virus | 11 |
| 1.4. Klinik | 12 |
| 1.5. Natürlicher Verlauf | 13 |
| 1.6. Diagnostik | 13 |
| 1.7. Prophylaxe und Therapie | 14 |
| 1.8. Genomorganisation | 17 |
| 1.8.1. Strukturelle HCV-Proteine | 18 |
| 1.8.2. Nicht strukturelle HCV-Proteine | 20 |
| 2. FRAGESTELLUNG | 24 |
| 3. MATERIAL, PATIENTEN UND METHODEN | 25 |
| 3.1. Enzyme, Lösungen, Puffer | 25 |
| 3.2. Geräte | 26 |
| 3.3. Kits | 26 |
| 3.4. Primer (Nukleotid-Position) | 27 |
| 3.5. Patienten | 27 |
| 3.6. RNA-Extraktion | 29 |
| 3.7. Reverse Transkription (RT) | 30 |
| 3.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 32 |
| 3.8.1. Nested-Polymerase-Ketten-Reaktion (nested-PCR) | 35 |
| 3.9. Gelelektrophorese | 36 |
| 3.10. Primer | 39 |
| 3.11. Sequenzanalyse | 40 |
| 3.12. Phylogenetische und Konformationsanalyse | 41 |
| 3.13. Datenpräsentation | 42 |
| 4. ERGEBNISSE | 43 |
| 4.1. Die Aminosäuresequenz der E2-Region | 43 |
| 4.2. Die Aminosäuresequenz der NS5A-Region | 46 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.3. | Virämie vor Therapie | 49 |
| 4.4. | Phylogenetische Analyse der E2- und NS5A-Sequenzen | 50 |
| 4.5. | Konformationsanalyse der E2- und NS5A-Region | 50 |
| 5. | DISKUSSION | 56 |
| 5.1. | Mutationen im Bereich des NS5A-Proteins | 56 |
| 5.2. | HCV RNA-Konzentration und E2-/NS5A-Mutationen | 58 |
| 5.3. | Mutationen im Bereich des E2-Proteins | 59 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 62 |
| 7. | SUMMARY | 64 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 65 |

Abkürzungen, Abbildungen und Tabellen

| | |
|---------------|--|
| 3'NTR | 3' nicht translatierte Region |
| 5'NTR | 5' nicht translatierte Region |
| ALT | Alaninaminotransferase |
| AST | Aspartataminotransferase |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cons | Konsensussequenz |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| E1-Protein | Envelope (Hüll)-Protein 1 |
| E2-Protein | Envelope (Hüll)-Protein 2 |
| E. coli | Escherichia coli |
| EIA | Enzymimmunoassay |
| eIF2 α | eukaryontischer Initiationsfaktor der Translation 2 α |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| eR | endoplasmatisches Retikulum |
| ETR | End of treatment response |
| HBs-Antigen | Hepatitis B-surface-Antigen |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HIV | Humanes Immunodefizienz Virus |
| HVR1 | Hypervariable Region 1 |
| IFN | Interferon |
| IRBS | Interne Ribosomen-Bindungsstelle |
| ISDR | Interferon-Sensitivität determinierende Region |
| IU | Internationale Einheiten |
| i. v. | intravenös |
| kDA | Kilo-Dalton |
| μ l | Mikroliter |
| mA | Milliampere |
| ME | Millionen Einheiten |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |

| | |
|--------------|---|
| M-MLV-RT | Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transkriptase |
| NANB | Non-A-non-B |
| NS2A-Protein | Nicht strukturelles Protein 2A |
| NS3A-Protein | Nicht strukturelles Protein 3A |
| NS4A-Protein | Nicht strukturelles Protein 4A |
| NS4B-Protein | Nicht strukturelles Protein 4B |
| NS5A-Protein | Nicht strukturelles Protein 5A |
| NS5B-Protein | Nicht strukturelles Protein 5B |
| NR | Non response |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PePHD | PKR-eIF2 α -Phosphorylierungs-Homologie Domäne |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PKR | Doppelstrang RNA-aktivierte Proteinkinase |
| PKR-BR | PKR-Bindungsregion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkription |
| SR | Sustained response |
| U/min. | Umdrehungen pro Minute |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| V3 | Variable Region 3 |
| vs | versus |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------------|---|----|
| Abbildung 1: | HCV-Polyprotein mit strukturellen und nicht strukturellen Proteinen | 17 |
| Abbildung 2: | Strukturelle Proteine und PePHD des HCV | 19 |
| Abbildung 3: | NS5A-Protein und seine C-terminalen Abschnitte | 23 |
| Abbildung 4: | Virologische Therapieergebnisse der 33 Patienten | 28 |
| Abbildung 5: | Schematische PCR zur Vervielfältigung von DNA | 34 |
| Abbildung 6 und 7: | Fotos einer Gelelektrophorese unter UV-Licht nach RT-PCR der NS5A-Region links und der E2-Region rechts verschiedener Patienten | 38 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 8: Sequenzvergleich der E2-Region 638 bis 704 aller untersuchten Patienten mit der Konsensussequenz cons | 45 |
| Abbildung 9: Sequenzvergleich der E2-Region zwischen Kodon 638 und 704 ausgewählter Patienten vor und nach Therapie mit den HCV-3a-Prototypsequenzen bzw. der Konsensussequenz | 46 |
| Abbildung 10: Sequenzvergleich der untersuchten Patienten und der Prototypsequenzen bzw. der Konsensussequenz zwischen Kodon 2144 und 2300 | 48 |
| Abbildung 11: Phylogenetischer Baum der E2-Region aus allen 33 Patienten sowie der Prototypen HCV-K3a, NZL1 und der Konsensussequenz | 52 |
| Abbildung 12: Phylogenetischer Baum der NS5A-Region aller 33 Patienten sowie der Prototypen HCV-K3a, NZL1 und der Konsensussequenz | 53 |
| Abbildung 13: Baum zur Konformationsanalyse der E2-Sekundärstrukturen aller 33 Patienten, der Konsensussequenz sowie der Prototypsequenzen NZL1 und HCV-K3a | 54 |
| Abbildung 14: Baum zur Konformationsanalyse der NS5A-Sekundärstrukturen aller 33 Patienten, der Konsensussequenz sowie der Prototypsequenzen NZL1 und HCV-K3a | 55 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Therapieschemata | 29 |
| Tabelle 2: Ansatz für RT-PCR | 32 |
| Tabelle 3: Schema für PCR der E2-Region | 35 |
| Tabelle 4: Schema nested-PCR für die NS5A-Region | 36 |
| Tabelle 5: Schema für Sequenz-PCR der Einzelstränge | 41 |
| Tabelle 6: Vergleich HCV RNA-Titer vor Therapie und Anzahl der Mutationen innerhalb der PePHD mit ihren angrenzenden Regionen und der PKR-Bindungsregion mit ihren Nachbarregionen | 49 |
| Tabelle 7: Anzahl der Mutationen innerhalb der verschiedenen E2- und NS5A-Regionen | 49 |

1. Einleitung

1.1. Entdeckung des Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C-Virus (HCV) wurde zuerst von Q. L. Choo et al. 1988/89 molekularbiologisch beschrieben [11]. Eine eindeutige elektronenmikroskopische Darstellung der vermutlich 55-65 nm großen Hepatitis C-Viruspartikel ist bislang nicht gelungen [102].

Vor der Entdeckung des HCV wurden Hepatitiden unklarer Ätiologie als Non-A-Non-B (NANB)-Hepatitiden bezeichnet. Auf der Grundlage der HCV-Antikörper-Diagnostik konnten ca. 90 % der NANB-Hepatitiden ätiologisch einer HCV-Infektion zugeordnet werden. Die chronische Hepatitis C ist weltweit eine der Hauptursache für eine chronische Lebererkrankung. In Deutschland wird die Prävalenz der chronischen Hepatitis C auf 0,4 bis 0,6 %, entsprechend ca. 400.000 Patienten, geschätzt. In den westlichen Industrienationen hat die Zahl der Patienten mit chronischer Hepatitis C die der Fälle mit chronischer Hepatitis B überschritten [39].

Das HCV gehört zur Familie der Flaviviridae und wird in den eigenen Genus Hepacivirus eingruppiert.

1.2. Genotypen/Variabilität

Bisher sind mindestens sechs Genotypen mit zahlreichen Subtypen für das Hepatitis C-Virus bekannt [103]. Die Bildung von ähnlichen, aber doch verschiedenen HCV-Isolaten wird der hohen Ungenauigkeit der HCV-abhängigen RNA-Polymerase zugeschrieben. Die entstehenden Mutationen (Rate von $1,92 \times 10^{-3}$ pro Nukleotidposition und Jahr) führen zu der gleichzeitigen Existenz von verschiedenen Isolaten des HCV in einem Individuum (genannt Quasispezies) mit einer maximalen Aminosäurevariabilität von ca. 10 % [8,75,79,104]. Die Unterteilung der Genotypen erfolgte anhand von Aminosäuresequenzvergleichen im Bereich der NS5B-Region. Bei diesen Vergleichen wiesen die gefundenen Genotypen 1 bis 6 nur eine Sequenzhomologie von 56 bis 72 % auf, die Subtypen untereinander eine Ähnlichkeit von 74 bis 86 %, Übereinstimmungen von 88 bis

100 % wurden bei verschiedenen Isolaten der HCV-Quasispezies zugeschrieben [103].

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen der 5' nicht translatierten Region (5'NTR) können Genotypen und mit Einschränkungen auch Subtypen klassifiziert werden. Die 5'NTR wird als hoch konserviert bezeichnet, es zeigen sich dort nur wenige Nukleotidunterschiede zwischen den verschiedenen Geno-/-Subtypen.

Die verschiedenen HCV-Geno-/-Subtypen weisen eine unterschiedliche geografische Verteilung auf. In Europa, den USA und Japan finden sich am häufigsten Infektionen mit dem Genotyp 1. Der Genotyp 4 kommt typischerweise in Ägypten und dem Mittleren Osten, der Genotyp 5 in Südafrika und der Genotyp 6 in Hongkong und Südostasien vor [39,103]. In den letzten Jahren sind weitere Genotypen hinzugekommen, vor allem in Südostasien, wo Patienten, die mit dem Genotyp 1b infiziert waren, bei nochmaligen Untersuchungen letztendlich als Typ 7, 8 oder 9 klassifiziert wurden [17]. Weiterhin findet sich ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich des Ansprechens auf eine Interferon-alfa-basierte antivirale Therapie zwischen den verschiedenen Genotypen. Dabei kommt es bei Infektionen mit den Genotypen 2 und 3 ca. doppelt so häufig zu einem dauerhaften virologischen Therapieansprechen, als bei einer Genotyp 1-Infektion [15,23,65,83,123].

1.3. Übertragung des Hepatitis C-Virus

Das Hepatitis C-Virus wird parenteral übertragen, wobei die Übertragung vor der Routinetestung auf HCV-Antikörper bzw. HCV RNA häufig über Blut und Blutprodukte geschah. Auch ist eine Übertragung durch unzureichend sterilisiertes Mehrwegmaterial in Krankenhäusern möglich [40]. Bekannte parenterale Übertragungswege sind außerdem das needle-sharing bei i. v.-Drogenabhängigen, Nadelstichverletzungen, Akupunkturen, Tätowierungen oder der gemeinsame Gebrauch z. B. eines Rasierers in häuslichen Lebensgemeinschaften. Das Risiko einer vertikalen Übertragung des HCV von Mutter auf Kind während der Geburt beträgt 3 bis 6 % [39,122]. Eine gleichzeitig bestehende HIV-Infektion der Mutter führt zu einer Erhöhung des Übertragungsrisikos für das HCV. Die Wahrscheinlichkeit einer sexuellen Übertragung durch Geschlechtsverkehr ist mit ca. 1 bis 3 % gering. Zu den Personen, die ein erhöhtes Risiko besitzen an einer chroni-

schen Hepatitis C zu erkranken, gehören also Empfänger von Blut- und Blutprodukten, Dialysepatienten, Drogenabhängige, Familienangehörige von Infizierten, Angestellte im Gesundheitswesen, aber auch HIV-Infizierte. Trotz der bekannten Infektionsmechanismen, bleibt der Übertragungsweg bei einem Teil der Patienten unbekannt. Bei genauer und wiederholter Befragung reduziert sich der Anteil jedoch auf ca. 10-20 % [122].

1.4. Klinik

Die Inkubationszeit für die HCV-Infektion beträgt 4 bis 12 Wochen. Eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus führt zu einer akuten Hepatitis C, die in ca. 80 % der Fälle asymptomatisch verläuft. Häufig werden fluktuierende Aminotransferaseaktivitäten bei einer akuten Hepatitis C gefunden. Nach einer HCV-Infektion kommt es vermutlich in Abhängigkeit der initialen Menge an Virusinokulat, dem HCV-Genotyp und dem klinischen Verlauf in 50 bis 80 % der Fälle zu einem chronischen Verlauf [39].

Bei einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion finden sich meist nur uncharakteristische Symptome wie Müdigkeit, rechtsseitige Oberbauchbeschwerden und eine allgemeine Leistungsminderung. Neben einer chronischen Hepatitis kommt es bei einem Teil der Patienten zu extrahepatischen Manifestationen (z. B. Hashimoto-artige Thyreoiditis, Kryoglobulinämie, Sicca-Syndrom, Glomerulonephritis u. a.).

Typischerweise lassen sich bei einer chronischen Hepatitis C erhöhte Transaminasen nachweisen. Es werden jedoch auch Fälle mit persistierend normalen Leberwerten beobachtet. Daher ist zum Ausschluss einer HCV-Infektion eine Untersuchung auf HCV-Antikörper notwendig. Bei positiven HCV-Antikörpern wird eine chronische Infektion durch einen positiven HCV RNA-Nachweis bestätigt, während bei einer ausgeheilten HCV-Infektion keine HCV RNA nachweisbar ist. Die HCV RNA-Konzentration und auch die Infektion mit einem bestimmten Genotyp korrelieren nicht mit der Schwere und dem Progress der Erkrankung, sind aber für die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Interferon-basierte antivirale Therapie von Bedeutung. Zur Einschätzung der Aktivität und des Stadiums einer chronischen Hepatitis C ist die Durchführung einer Leberpunktion notwendig.

1.5. Natürlicher Verlauf

Patienten mit einer chronischen Hepatitis C haben ein Risiko von ca. 20-40 % für die Entwicklung einer Leberzirrhose in einem Zeitraum von 20 bis 30 Jahren, wobei die Angaben zur Häufigkeit des Auftretens einer Leberzirrhose im Verlauf einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion erheblich zwischen den verschiedenen retrospektiven und prospektiven Studien schwanken [18,37,50,54,58,64,71,76,89,100,112,113,115,117,120]. Durch zusätzliche Lebererkrankungen bzw. eine HIV-Koinfektion oder einen Alkoholabusus wird das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose signifikant erhöht bzw. die Dauer bis zum Entstehen einer Leberzirrhose signifikant erniedrigt. Bei einer bestehenden Leberzirrhose beträgt das Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinomes (HCC) ca. 3-5 % pro Jahr [39,110]. Entsprechend dem typischen Infektionszeitpunkt vor der Entdeckung des HCV, also vor 1989 und der Dauer von 20 bis 30 Jahren bis zur Entwicklung einer Leberzirrhose, nimmt in den letzten Jahren die Prävalenz des hepatozellulären Karzinomes auf der Grundlage einer chronischen Hepatitis C in den westlichen Industrienationen zu.

1.6. Diagnostik

Bei Verdacht auf eine Hepatitis C sollte als erstes ein Antikörpersuchtest mittels Enzymimmunoassay (EIA) zur Verifizierung der Erkrankung durchgeführt werden. Hiermit werden Antikörper gegen ein Strukturprotein (Core-Antigen) und Nichtstrukturproteine (NS3-, NS4- und NS5-Region) des Hepatitis C-Virus nachgewiesen. Der Antikörpertest wird 4 bis 6 Wochen nach Infektion positiv. Bei Verdacht auf eine kürzlich zurückliegende HCV-Infektion muss daher zusätzlich eine Untersuchung auf HCV RNA erfolgen. Bei Patienten mit einer Immunsuppression und bei Dialysepatienten findet sich in bis zu 4 % der Fälle ein Fehlen von HCV-Antikörpern, trotz einer chronischen Infektion, sodass auch hier die Diagnose der Hepatitis C über den Nachweis der HCV RNA erfolgen muss [122].

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach vorheriger reverser Transkription (RT) kann die HCV RNA bereits in der ersten Woche nach Infektion

detektiert werden. Der Nachweis der HCV RNA ist mit einer etwas höheren Sensitivität qualitativ (untere Nachweisgrenze 5-50 IU/ml) und auch quantitativ (ca. 500 IU/ml bis 8 Millionen IU/ml) möglich. Für beide Nachweisverfahren stehen standardisierte Testsysteme zur Verfügung [90].

Die Bestimmung des HCV-Genotyps/-Subtyps erfolgt in der klinischen Routine mit einem Hybridisierungstest mit geno- und subtypspezifischen Sonden im Bereich der 5' nicht translatierten Region, nach Amplifikation der HCV RNA. Mit diesem Verfahren ist eine korrekte Geno-/Subtypisierung in über 95 % der Fälle möglich, wenngleich auch eine Unterteilung bestimmter Subtypen (z. B. 2a und 2c) nicht und die Differenzierung zwischen den Subtypen 1a und 1b nur in etwa 90 % der Fälle möglich ist [39].

Zur Beurteilung der Aktivität der Erkrankung in der Leber gilt nach wie vor die Leberbiopsie als Goldstandard. Histologisch ist eine Bestimmung der entzündlichen Aktivität (Grading) aber auch des Fibrosegrades (Staging) mit Hilfe von verschiedenen Scoringssystemen möglich (z. B. Knodell-Score) [55].

1.7. Prophylaxe und Therapie

Ein Impfstoff zur Primärprophylaxe einer HCV-Infektion steht zur Zeit nicht zur Verfügung und die genetische Heterogenität und Variabilität des HCV machen eine Entwicklung eines solchen Impfstoffes für die nächsten Jahre unwahrscheinlich. Bereits in den späten 80er Jahren wurde eine Therapie der NANB-Hepatitis mit Interferon-alfa untersucht. Nach der Charakterisierung des HCV in Studien Anfang der 90er Jahre fand sich eine Ansprechrate mit dauerhafter Elimination des HCV auf eine Interferon-alfa-Monotherapie in ca. 10-20 % der Fälle [3,15,65,83,87].

Mitte der 90er Jahre wurde in ersten Studien eine Therapie der chronischen Hepatitis C mit dem für seine antivirale Aktivität gegenüber einer Reihe von DNA- und RNA-Viren bekannten Guanodin-Analogon Ribavirin untersucht [9]. Als Monotherapie konnte keine antivirale Aktivität mit einer Abnahme der HCV RNA-Konzentration nachgewiesen werden [19,32,97]. Als Kombinationstherapie mit Interferon-alfa fand sich jedoch ein signifikanter Anstieg der dauerhaften Ansprech-

raten auf ca. 40 % [36]. In den Zulassungsstudien für die Interferon-alfa-/Ribavirinkombinationstherapie fanden sich dauerhafte Ansprechraten von ca. 40 %, wobei eine Behandlung über 48 Wochen bei Patienten mit einer Genotyp 1-Infektion, der über 24 Wochen deutlich überlegen war. Eine Steigerung der Ansprechraten fand sich auch bei Kombinationstherapien mit Interferon-alfa und Ribavirin bei Patienten, die schon einmal eine Interferon-Monotherapie erhalten und einen Rückfall erlitten hatten [15,87].

Für die Standard-Interferon-alfa-/Ribavirinkombinationstherapie fanden sich folgende günstige Parameter vor Therapiebeginn, die mit einem häufigeren dauerhaften Ansprechen auf die Therapie assoziiert waren: Infektion mit dem Genotyp 2 oder 3, HCV RNA-Konzentration unter 2×10^6 Kopien/ml Serum, Alter unter 40 Jahre, weibliches Geschlecht, geringer Fibrosegrad der Leber [1,3,83,105,121]. Die Faktoren Alter, Geschlecht und Fibrosegrad der Leber konnten jedoch nicht einheitlich in allen Studien als eindeutige Parameter für einen Therapieerfolg nachgewiesen werden [15,87].

Auch unter der Kombinationstherapie mit Interferon und Ribavirin über 48 Wochen waren wesentliche Unterschiede beim dauerhaften virologischen Ansprechen zwischen den Genotypen 1 sowie 2 und 3 nachweisbar (28-36 % vs. 61-79 %) [15,29,63,65].

Durch die gegenwärtige Standardtherapie mit pegyliertem Interferon-alfa und Ribavirin konnte eine weitere Steigerung der dauerhaften Ansprechraten, insbesondere bei Patienten mit einer Genotyp 1-Infektion (42-52 %), erreicht werden. Diese lag wiederum hochsignifikant unter der Rate von Patienten mit einer Genotyp 2- oder 3-Infektion (76-82 %). Durch die Kopplung des Interferon-alfa an ein Polyethylenglykolmolekül (PEG-Interferon) kommt es zu einer verlängerten Halbwertszeit mit der Möglichkeit einer einmal wöchentlichen Applikation gegenüber den früheren täglichen bis dreimal wöchentlichen Injektionen des Standard-Interferon-alfa. Die insgesamt sehr hohen Ansprechraten bei Patienten mit einer Genotyp 2-/3-Infektion haben zu der Frage geführt, ob bei gleicher Effektivität eine Verkürzung der Therapiedauer von den üblichen 48 auf 24 Wochen möglich ist.

Dies konnte nun auf der Grundlage von großen Studien in zwei Publikationen aus dem Jahr 2004 gezeigt werden. Die dauerhaften Ansprechraten lagen dabei für

eine 24-wöchige Therapie bei 81-84 % und damit nicht signifikant unter der einer 48-wöchigen Behandlung (79-84 %) [38,125]. Zudem fanden sich in einer Studie ähnlich hohe Ansprechraten nach einer Therapie über 24 Wochen, wenn in Kombination mit PEG-Interferon-alfa2a statt der üblichen körperrgewichtsadaptierten Ribavirindosis (1000 bzw. 1200 mg/die) alle Patienten mit einer Genotyp 2-/3-Infektion 800 mg Ribavirin pro Tag erhielten (81 % vs. 84 %).

Unter der (PEG)Interferon-/Ribavirin-Kombinationstherapie kommt es zu vielfältigen und relevanten Nebenwirkungen mit insbesondere initial grippeähnlichen Symptomen, Übelkeit, allgemeine Leistungsminderung, Appetitlosigkeit, Anämie, Abfall der Leuko- und Thrombozyten, Depressionen, Schlafstörungen, Haarausfall, Hautveränderungen, Störung der Libido und der Schilddrüsenfunktion [3,124].

1.8. Genomorganisation

Das Hepatitis C-Virus besteht aus einem positiven einsträngigen RNA-Genom von ca. 9,6 kb, welches sich in einem Nukleokapsid befindet. In einem offenen Leserahmen kodiert es für ein Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren Länge. Dieses Polyprotein bzw. Teile davon zeigen Ähnlichkeiten zu Pestiviren und zu Flaviviren [12]. Die Spaltung in die einzelnen HCV-Proteine erfolgt während und nach der

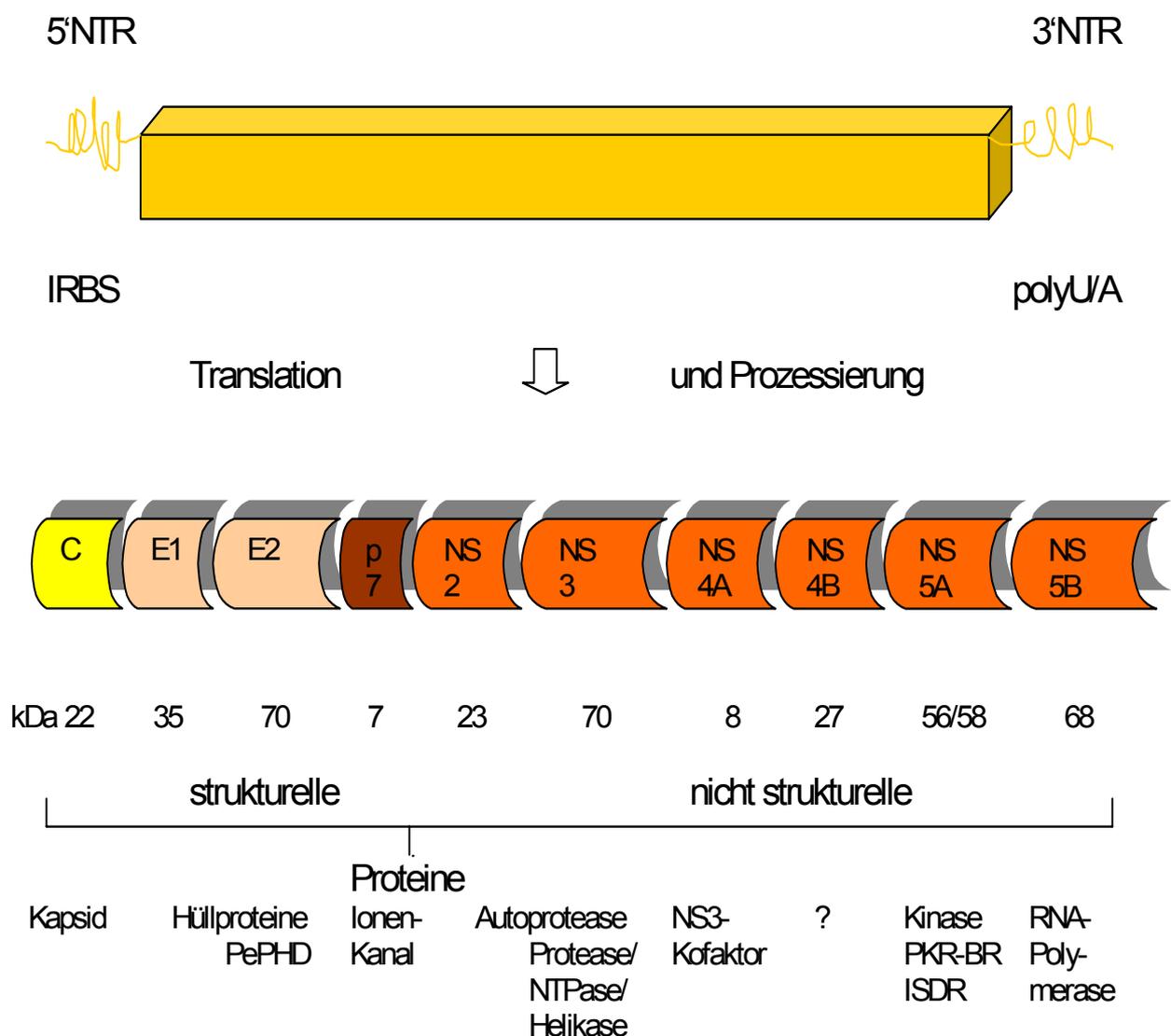


Abbildung 1: HCV-Polyprotein mit strukturellen und nicht strukturellen Proteinen

Translation mit Hilfe von wirts- und viruseigenen Proteasen. Am 5'-Ende geht der kodierenden HCV-RNA eine ca. 341 Nukleotide umfassende, nicht translatierte Region (5'NTR) voraus. Diese Region ist hoch konserviert. Die 5'NTR bildet eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRBS), die eine direkte Bindung des Ribosoms vor dem Initiationskodon ermöglicht. Nach dieser Region kodiert das Genom für das eigentliche Polyprotein, welches aus strukturellen und nicht strukturellen Proteinen besteht (Abb. 1). Am Ende dieses translatierten Abschnittes schließt sich wieder eine nicht translatierte Region (3'NTR) an. Diese besteht aus einem kurzen, wenig konservierten Abschnitt mit einem polyU/A-Trakt sowie einem hoch konservierten Abschnitt mit 98 Nukleotiden Länge. Die Region am 3'-Ende ist vermutlich für die Virusreplikation notwendig.

1.8.1. Strukturelle HCV-Proteine

Durch mehrere Spaltungen des Polyproteins mittels Protease vom aminoterminalen Ende aus entstehen die strukturellen Proteine core, E1 und E2 sowie p7, welches aber nur eine unvollständige Spaltung von E2 erfährt. Für das core-Protein wurde eine Größe von 22, für E1 35, E2 70 und für p7 von 7 kDa ermittelt (Abb. 1 und 2).

Das core-Protein wird durch Phosphokinasen phosphoryliert und ist in der Lage virale RNA zu binden. Seine Hauptlokalisierung wurde im endoplasmatischen Retikulum (eR) beschrieben. Es besitzt Ähnlichkeiten zu bekannten Nukleokapsiden anderer Flaviviren, sodass man annimmt, dass es ebenso für die Bildung des Kapsids des HCV verantwortlich ist [39].

Die beiden Hüllproteine E1 und E2 bilden ein Heterodimer, wobei sich im aminoterminalen Bereich des E2 eine so genannte hypervariable Region 1 (HVR1) von ca. 27 Aminosäuren Länge befindet. Im karboxyterminalen Teil von E1 und E2 befinden sich Ankerdomänen, die eine Verbindung mit der Membran des eR ermöglichen [68]. Das E2-Protein stellt ein typisches Typ1-Membran-assoziiertes Glykoprotein dar [27]. Am karboxyterminalen Ende des E2-Proteins befindet sich ebenfalls ein Bereich, der Sequenzähnlichkeiten zur Doppelstrang-RNA aktivierten Proteinkinase (PKR) und zum Translationsinitiationsfaktor eIF2 α besitzt, der durch

die PKR phosphoryliert wird und dadurch eine Blockierung der Proteinsynthese des Virus hervorruft. Der Bereich auf dem E2-Protein umfasst 12 Aminosäuren und wird als PePHD (PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain) bezeichnet (Abb. 2). Die PePHD der relativ Interferon-resistenten HCV-Genotyp-1a- und -1b-Isolate weist eine hohe Homologie zu PKR/eIF2 α auf, während dies bei den Interferon-sensitiven HCV-Genotyp-2/3-Isolaten nicht der Fall ist. Dadurch, dass das E2-Protein in vitro eine Bindung und funktionelle Inhibition der Proteinkinase bewirkt, könnte es so zu einer relativen IFN-Resistenz der HCV-Genotypen 1a und 1b mit beitragen [108]. Ob klinisch Mutationen im Bereich der PePHD des E2-Proteins die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber einer antiviralen Therapie bei Patienten mit z. B. einer Genotyp 1- oder 3-Infektion beeinflussen, ist zunächst nicht bekannt gewesen.

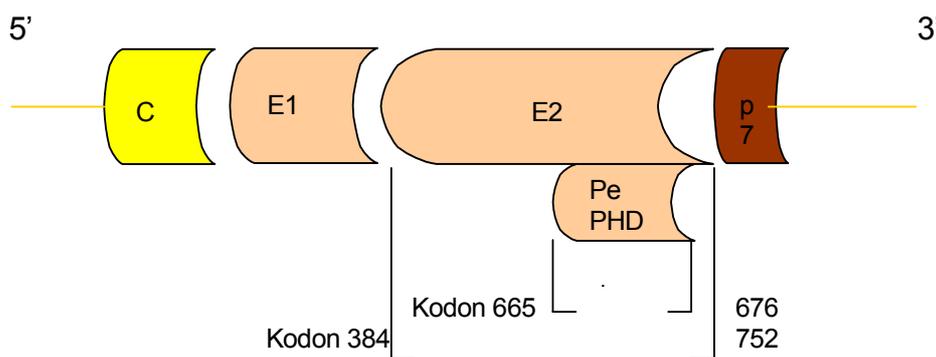


Abbildung 2: Strukturelle Proteine und PePHD des HCV (Kodons nach HCV-NZL1)

Weiterhin konnte eine Bindung des HCV-E2-Proteins an den zellulären Rezeptor CD81 nachgewiesen werden. Durch diese Verbindung wird die Aggregation von T-Lymphozyten induziert und die Proliferation von B-Zellen blockiert [20,26]. Die Expression des CD81-Rezeptors korreliert mit dem HCV-Genotyp und dem virologischen Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie [60].

An E2 schließt sich p7 an, welches einen Ionenkanal darstellt und hexamere Komplexe bildet [77].

1.8.2. Nicht strukturelle HCV-Proteine

Die nicht strukturellen Proteine des Hepatitis C-Virus beginnen mit einer Autoprotease, die aus NS2 und einem Teil von NS3 besteht und nur an der NS2/NS3-Verbindung spaltet [42]. Alle übrigen Prozessierungen zwischen den Nichtstrukturproteinen werden durch die NS3/NS4A-Protease durchgeführt.

Das 70 kDa große NS3-Protein besteht aus einer Serinprotease im N-terminalen Teil. Im C-terminalen Anteil findet sich eine RNA-abhängige NTPase/RNA-Helikase. Für die Spaltung von NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B bildet das NS3-Protein einen Komplex mit dem Kofaktor NS4A [4,24,52].

Über das NS4B-Protein ist bisher wenig bekannt. Es ist vermutlich bei der Bildung eines Replikationskomplexes als Ankerdomäne von Bedeutung und besitzt eine Größe von 27 kDa. Zusammen mit NS4A soll es die zelluläre Proteinsynthese durch Eingriff in den Translationsprozess blockieren [48].

Das NS5A-Protein bildet nach der Abspaltung von NS4B und NS5B eine phosphorylierte (56 kDa) und eine hyperphosphorylierte Form (58 kDa) aus. Die Bildung der hyperphosphorylierten Form ist vom Vorhandensein des NS4A abhängig. Das NS5A-Protein weist im aminoterminalen Bereich eine amphipathische α -Helix als zytoplasmatische Ankerdomäne auf [80]. Ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) am C-terminalen Ende führt zur Translokation einer aminoterminal trunkierten Form des NS5A-Proteins in den Zellkern [46]. Weiterhin befindet sich im karboxyterminalen Bereich des NS5A-Proteins eine so genannte PKR-bindende Domäne, die eine Interferon-Sensitivität determinierende Region (ISDR) umfasst (Abb. 3).

Klinisch weisen insbesondere die unterschiedlichen virologischen Ansprechraten der verschiedenen HCV-Genotypen (HCV 1 vs. HCV 2/3) auf eine spezifische Hemmung der Interferonwirkung durch das Hepatitis C-Virus hin. In vitro konnte eine spezifische Hemmung der Interferon-induzierten PKR-Aktivierung durch das NS5A-Protein nachgewiesen werden [30,31,109,108]. Daher stellt sich die Frage, ob Mutationen im Bereich der vermuteten Interaktionsstelle der PKR mit dem NS5A-Protein bei der Untersuchung einzelner HCV-Isolate von Patienten mit chronischer Hepatitis C die Sensitivität gegenüber einer Interferon-basierten Therapie erklären. Bereits vor der Beschreibung der in vitro NS5A/PKR-Interaktion

über eine vermutete PKR-bindende Domäne wurde von der japanischen Arbeitsgruppe um Enomoto ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mutationen in der Interferon-Sensitivität determinierenden Region (ISDR) des NS5A-Proteins und dem virologischen Ansprechen auf eine IFN- α -Therapie bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1b-Infektion beschrieben. Dabei wurde bei allen Patienten mit mindestens 4 Aminosäuremutationen im Bereich der ISDR im Vergleich zur Prototypsequenz HCV-J ein dauerhaftes virologisches Ansprechen auf eine Interferon- α -Therapie gefunden [23]. In der Folge wurde von verschiedenen japanischen, europäischen und amerikanischen Arbeitsgruppen diese Korrelation an eigenen Patienten überprüft. Dabei konnte im Wesentlichen von japanischen Arbeitsgruppen eine Korrelation der Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR mit dem Therapieansprechen bestätigt werden [10,22,41,56,61,69]. In Europa, Nordamerika und Taiwan hingegen war der Zusammenhang für HCV-1a/b-infizierte Patienten nicht eindeutig vorhanden [14,43,51,57,62,66,74,86,93,106,123]. Insbesondere waren dabei HCV-Isolate mit multiplen Mutationen innerhalb der ISDR bei Patienten aus westlichen Ländern im Vergleich zu japanischen Patienten nur selten vorhanden. An größeren Patientenkollektiven und in einer Metaanalyse zeigte sich jedoch, dass auch bei europäischen Patienten mit multiplen Mutationen innerhalb der ISDR eine Korrelation mit dem virologischen Therapieansprechen auf eine Kombinationstherapie mit Interferon und Ribavirin besteht [10,78,118]. Allerdings fanden sich bei der überwiegenden Mehrzahl der HCV-1a/b-infizierten Patienten mit dauerhaftem Therapieansprechen keine oder lediglich wenige Mutationen innerhalb der ISDR/PKR-bindenden Region, sodass der Zusammenhang mit einer NS5A/PKR-Interaktion bei diesen Patienten nicht bestätigt werden konnte [95]. In Verbindung dazu zeigte sich bei in vitro-Versuchen mit einem Klon mit fehlender ISDR trotzdem eine Unterdrückung der PKR-Aktivität [72].

Um eine mögliche Bedeutung von Mutationen außerhalb der ISDR/PKR-bindenden Region aber innerhalb des NS5A-Proteins zu untersuchen, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen das gesamte 447 Aminosäuren umfassende NS5A-Gen von HCV-1a- bzw. -1b-infizierten Patienten sequenziert. Dabei fand sich bei einzelnen HCV-1b-Isolaten zunächst eine Korrelation von Mutationen innerhalb der karboxyterminalen Hälfte des NS5A-Proteins, in der verschiedene funktionell bedeutende Regionen vermutet werden, mit dem Therapieansprechen.

Für HCV-1a-Isolate konnte eine Zuordnung der Mutationen zu der karboxyterminal gelegenen variablen Region 3 (V3) vorgenommen werden [21,73,96]. In einer Untersuchung aus der Arbeitsgruppe von Sarrazin et al. wurde dann bei weiteren 45 HCV-1b-infizierten Patienten das gesamte NS5A-Gen sequenziert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass zwar in keiner bisher bekannten funktionell bedeutenden Region des NS5A-Proteins, wohl aber Aminosäuremutationen im Bereich des Gesamt-NS5A-Proteins hochsignifikant mit dem virologischen Therapieansprechen assoziiert sind. Außerdem konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der Gesamtzahl der Aminosäuremutationen im NS5A-Protein mit der Geschwindigkeit des Abstiegs in der zweiten Phase der initialen Viruskinetik bestätigt werden. In dieser Untersuchung wurden funktionelle als auch konformationelle Aspekte der Aminosäuremutationen mit einbezogen und ein neues mathematisches Modell zur Charakterisierung von lokalen Akkumulationen von Mutationen in bisher nicht bekannten, potenziell bedeutsamen Regionen etabliert. Dabei fanden sich Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von Mutationen im Bereich der V3-Region in Zusammenhang mit dem Therapieansprechen [99].

Für den Genotyp 2a wurde ebenfalls eine Korrelation der Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR mit dem Therapieansprechen gefunden [69].

Für Patienten mit einer Genotyp 3a-Infektion war der Zusammenhang zwischen Mutationen im Bereich der ISDR/PKR-bindenden Region zunächst praktisch unbekannt.

Das NS5B-Protein (68 kDa) zeigt typische Sequenzmuster einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Durch Überexpression in einem rekombinanten Virussystem konnte für NS5B entsprechend eine RNA-Polymeraseaktivität nachgewiesen werden [5].

5'

3'

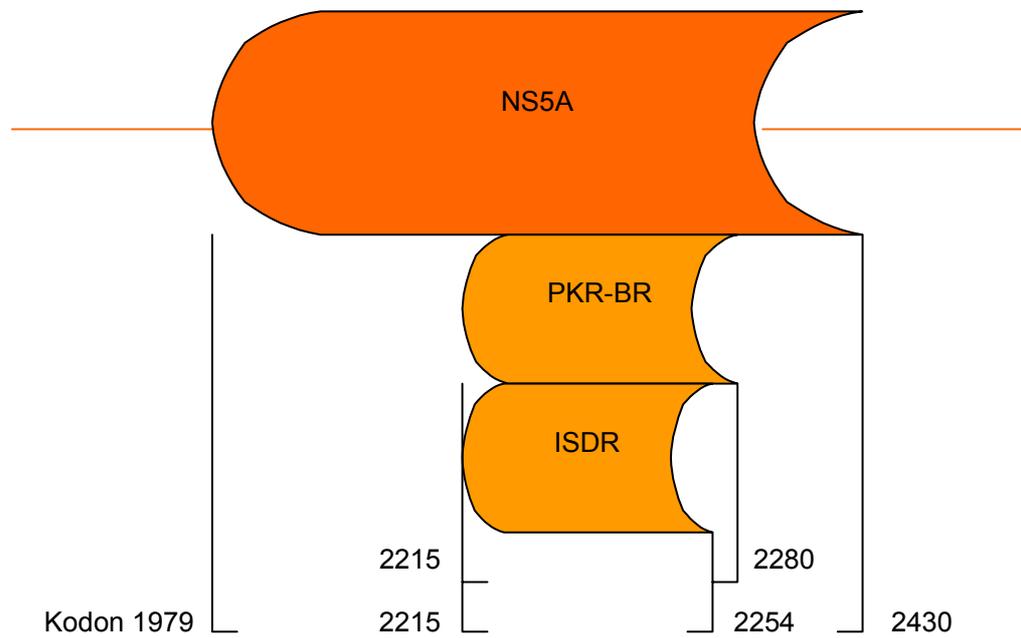


Abbildung 3: NS5A-Protein und seine C-terminalen Abschnitte (Kodons nach HCV-NZL1)

2. Fragestellung

Veränderungen in den in vitro PKR-bindenden Regionen der E2- und NS5A-Proteine des Hepatitis C-Virus werden mit einer unterschiedlichen Sensitivität auf eine Interferon-alfa-basierte Therapie in Verbindung gebracht. Während die klinische Bedeutung von Mutationen im Bereich der ISDR/PKR-bindenden Domäne des NS5A-Proteins bei Patienten mit einer HCV-1-Infektion bereits gut untersucht war, gab es keine Daten für Patienten mit einer Genotyp 3a-Infektion zu Mutationen sowohl im Bereich des NS5A- als auch des E2-Proteins im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu analysieren, ob Mutationen innerhalb des E2- und NS5A-Proteins, insbesondere im Bereich der PePHD des E2 und der ISDR/PKR-Bindungsregion des NS5A, mit dem virologischen Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine Interferon-alfa-basierte Therapie bei Patienten mit einer HCV-3a-Infektion zusammenhängen.

3. Material, Patienten und Methoden

3.1. Enzyme, Lösungen, Puffer

| | |
|---|---|
| Aqua ad injectabilia | B. Braun, Melsungen AG, Deutschland |
| TBE-Puffer 0,5x | 900 ml aqua ad injectabilia + 100 ml TBE-Puffer 5x |
| Baker HPLC H ₂ O | Mallinckrodt Baker B.V., Deventel, Holland |
| Ethanol 75 % und 100 % | Riedel-deHaen, Seelze, Deutschland |
| MgCl ₂ 25 mM | Perkin Elmer, Roche, Branchburg, USA |
| Nukleotide 10 mM | dNTP Mix, Invitrogen, Kalifornien, USA |
| 10x PCR Puffer II | Perkin Elmer, Roche, Branchburg, USA |
| Random Hexamere | Perkin Elmer, Roche, Branchburg, USA |
| RNase Inhibitor | GIBCO BRL [®] Life Technologies, Eggenstein, Deutschland |
| Reverse Transkriptase (SuperScript™) | GIBCO BRL [®] Life Technologies, Eggenstein, Deutschland |
| PCR Reaktionspuffer 10x | Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland |
| 10x PCR Puffer AmpliTaq [®] Gold | Perkin Elmer, Roche, Branchburg, USA |
| BigDye™ Deoxyterminator RR Mix | Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland |
| Template Suppressions Reagens | Applied Biosystems Division, Foster City, USA |
| DNA Längenstandard VI | Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland |
| NuSieve [®] 3:1 Agarose | FMC BioProducts, Rockland, USA |
| Ethidium-Bromid 1 % | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| PBS Puffer | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ladungspuffer | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

3.2. Geräte

| | |
|-----------------------------------|---|
| Pipetten 20, 200, 1000 µl | Pipetman, Gilson, Villieres-le-Bel, Frankreich |
| Gestopfte Pipettenspitzen | ART, Molecular Bioproducts, San Diego, USA |
| GeneAmp-Tubes + Gummistopfen | Perkin Elmer, Roche, Branchburg, USA |
| Laminar Abzug | Köttermann 8511, Uetze, Deutschland |
| Waage | Iso 9001, Sartorius, Deutschland |
| Zentrifuge 5417 C | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mini-Hybridisierungsöfen | OV1/OV2, Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Sequenzier (310 Genetic Analyzer) | ABI Prism™, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland |
| Elektrophoresekammer | Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, GIBCO BRL® Life Technologies, Eggenstein, Deutschland |
| Transilluminator (Fluo-Link) | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Polaroid-Kamera | Fotodyne, Hartland, USA |
| Cycler (PCR-System 9700) | GeneAmp®, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland |

3.3. Kits

| | |
|--------------------|--|
| HCV RNA Extraktion | QIAamp Viral RNA Kit (250), QIAGEN GmbH, Hilden, Germany |
|--------------------|--|

PCR-Produkt Aufreinigung

Microcon Centrifugal Filter Devices, Amicon, Witten, Deutschland

3.4. Primer (Nukleotid-Position)

| | | | |
|----------|-----------------------------------|----------------|------------|
| 3a5A-3s | 5'cag tgg atg aac agg ct3' | (≅ HCV-3a-NZL1 | 6097-6113) |
| 3a5A-5s | 5'gag cca gaa cca gat gt3' | (" | 6844-6860) |
| 3a5A-6s | 5'ca ccc aac tac act cgc gc3' | (" | 6581-6605) |
| 3a5A-20s | 5'ttc tty act gaa gtg gat gg3' | (" | 6718-6737) |
| 3a5A-21s | 5'cct ccc aag tat cct cca gc3' | (" | 7189-7208) |
| 3a5A-2a | 5'aa ggt aac ctt ctt ctg3' | (" | 7774-7790) |
| 3a5A-3a | 5'ct ttt cct ccg agg agg3' | (" | 7333-7349) |
| 3a5A-5a | 5'gga ggg gac ccg cgc gca aga c3' | (" | 6923-6944) |
| 3a5A-20a | 5'gt tgg tgg tac ata atc cgg3' | (" | 7267-7286) |
| 3a5A-21a | 5'tt gct gag mgg yct gat ggg3' | (" | 7693-7712) |
| 3aE2-1s | 5'ttg ttc aag gtg agg atg tt3' | (" | 2233-2252) |
| 3aE2-1a | 5'cc aar gcc ata aag gta ttg3' | (" | 2455-2474) |

3.5. Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 1998 und 1999 Seren von 33 Patienten (26 Männer, 7 Frauen) im Alter zwischen 26 und 51 Jahren aus Deutschland und teilweise Abstammung aus anderen europäischen Ländern untersucht. Alle waren mit dem Hepatitis C-Virus, Subtyp 3a, infiziert. Die Patienten waren negativ für das Hepatitis B-surface-Antigen (HBs-Antigen) und Antikörper gegen das humane Immunodefizienz-Virus 1 und 2 (HIV 1/2) getestet worden. Keiner war antiviral gegen die HCV-Infektion behandelt worden. Die verschiedenen Übertragungsrisiken bzw. -wege waren Drogenabusus (20), Bluttransfusionen (9) oder un-

bekannt (4). Die geschätzte Länge der bestehenden Infektion lag zwischen einem und zwanzig Jahren.

Die Diagnose chronische Hepatitis C basierte auf erhöhten Serum-Transaminasen (ALT, AST) innerhalb der letzten sechs Monate vor Therapiebeginn, der histologischen Untersuchung von Lebergewebe und dem Nachweis von HCV RNA im Serum. Auch anti-HCV-Antikörper waren bei allen Patienten vorhanden, der Nachweis hierfür erfolgte mittels einem ELISA der dritten Generation.

Die Patienten erhielten unterschiedliche Therapien. Fünfzehn Patienten bekamen während der ersten 12 Wochen dreimal wöchentlich 6 Millionen Einheiten (ME) IFN- α s.c., gefolgt von 3 ME IFN- α dreimal wöchentlich, bis insgesamt 48 Wochen erreicht waren. Sieben dieser Patienten erhielten zusätzlich Ribavirin 1000 mg/Tag bei einem Körpergewicht von ≤ 75 kg bzw. 1200 mg/Tag bei einem Körpergewicht von >75 kg. Die übrigen 18 Patienten wurden mit dreimal wöchentlich 3 ME IFN- α für insgesamt 48 Wochen behandelt, wovon 12 wiederum zusätzlich Ribavirin nach Körpergewicht, wie oben beschrieben, erhielten (Tab. 1). Sechzehn Patienten zeigten einen anhaltenden virologischen Behandlungserfolg (sustained response = SR) ohne Nachweis von HCV RNA 24 Wochen nach Beendigung der Therapie. Sechs Patienten zeigten einen Behandlungserfolg am Ende der Therapie ohne Nachweis von HCV RNA, wiesen aber bei Nachuntersuchungen innerhalb von 24 Wochen nach Therapieende wieder einen positiven HCV RNA-Test auf (end of treatment response = ETR). Elf Patienten zeigten auch am Ende der Behandlung kein virologisches Ansprechen auf die durchgeführte antivirale Therapie (non response = NR) und hatten auch während der Therapie persistierend positive HCV RNA-Testergebnisse (Abb. 4).

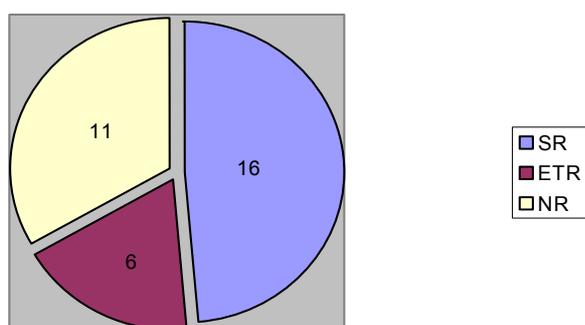


Abbildung 4: Virologische Therapieergebnisse der 33 Patienten

Die Studie fand mit Genehmigung des Ethik-Komitees für medizinische Forschung Frankfurt am Main und entsprechend der Helsinki-Deklaration von 1975 sowie der Zustimmung der einzelnen Patienten statt.

| Patienten | Therapieschema (IFN pro Woche) | | | Ribavirin |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 7 | 3x6 ME IFN- α 12 Wochen | 3x3 ME IFN- α 36 Wochen | | Ribavirin 1000/1200 mg |
| 8 | 3x6 ME IFN- α 12 Wochen | 3x3 ME IFN- α 36 Wochen | | |
| 12 | | | 3x3 ME IFN- α 48 Wochen | Ribavirin 1000/1200 mg |
| 6 | | | 3x3 ME IFN- α 48 Wochen | |

Tabelle 1: Verwendete Therapieschemata

3.6. RNA-Extraktion

Die zu untersuchenden Seren der einzelnen Patienten wurden zu je 100 μ l unter einer laminar flow-Anlage aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

Mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Kit wurde aus den entsprechenden 100 μ l-Serumproben virale RNA nach Anleitung des Herstellers extrahiert (QIAamp Viral RNA Mini Kit Handbook 01/99). Die Methode des Kits basiert auf einer Silikongel-Membran, an die sich RNA anlagert, während bei geeigneten Bedingungen die übrigen Serumanteile passieren können, sodass am Ende des Reinigungsvorganges reine RNA zur Weiterverarbeitung eluiert werden kann. Gegenüber der Methode mit Phenol-Chloroform ist die Extraktion mit dem QIAamp Kit weniger aufwändig und verglichen mit der Methode mit Silikonperlen werden weniger komplizierte Puffersysteme benötigt [101].

Die RNA-Extraktion beginnt mit der Inaktivierung von vorhandenen RNAsen und Zerstörung der Virushülle durch Zugabe von 400 μ l Buffer AVL + carrier RNA zu den 100 μ l-Serumproben. Für eine vollständige Lyse werden in der Regel zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur benötigt. Nachfolgende Zentrifugierung bei 8000 U/min. für 5 s. Zur Denaturierung und Fällung von Proteinen er-

folgt die Zugabe von 400 µl Ethanol 100 % in jedes Cup, es wird 5 s gemischt und bei 8000 U/min. zentrifugiert. Da die Filtersäulen nur ein begrenztes Fassungsvermögen besitzen, müssen die erhaltenen Gemische in zwei Teile geteilt, nacheinander auf die Säulen pipettiert und bei 8000 U/min. zentrifugiert werden. Die erhaltenen Filtrate werden verworfen. Dieser Schritt dient der Anlagerung der RNA + carrier RNA an die Silikongel-Membran und zur Trennung von groben Verunreinigungen bzw. von den vorher zugegebenen Lösungen. Zur vollständigen Reinigung werden zwei Waschgänge angeschlossen: Waschgang 1 mit je 500 µl Buffer AW1 (mit Ethanol 100 % versetzt) und Zentrifugierung mit 8000 U/min für eine Minute, danach Waschgang 2 mit 500 µl Buffer AW2 und Zentrifugierung mit 13000 U/min. für zwei Minuten. Die überschüssigen Filtrate werden jeweils verworfen. Durch diese Prozedur sollte eine völlig reine RNA an der Membran haften, die mit 50 µl RNase-freiem Puffer AVE bei 8000 Umdrehungen innerhalb einer Minute abzentrifugiert und in einem 1,5 ml-Cup aufbewahrt werden kann.

Zur weiteren Verwendung wird die gewonnene RNA bei -20° C aufbewahrt.

3.7. Reverse Transkription (RT)

Eine Vervielfältigung von RNA ist in einem Schritt möglich, z. B. mit dem Titan™One Tube RT-PCR Kit, welches wir anfänglich zum Einsatz brachten. Da zu wenig positive Proben als Ergebnis erzielt wurden, entschieden wir uns für einen Zwischenschritt über die reverse Transkription als eigenständigen Versuchsansatz. Bei der reversen Transkription wird vorhandene Einzelstrang-RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und einem Antisense-Primer in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA dient als Matrize für eine nachfolgende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Eine Vervielfältigung von RNA ist weniger effizient, als die Vervielfältigung von primärer DNA durch eine PCR (10 bis 30 % der RNA wird zu cDNA), aber dafür können sehr geringe Mengen an RNA erfasst werden [88].

Die RT wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und eines RNase-Inhibitors von GIBCO BRL®, Puffer, Hexameren und MgCl₂-Solution aus dem Ge-

neAmp[®] RNA Kit von Perkin Elmer sowie Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) von Invitrogen durchgeführt.

Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um Superscript[™] RNase H⁻, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine Variante der Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV-RT) darstellt. Hier hat eine Mutation zur Veränderung der RNase H-Sequenz beigetragen, wodurch die Aktivität der RNase H soweit reduziert wurde, dass sie praktisch nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dadurch entsteht ein DNA/RNA-Hybrid. Gleichzeitig sinkt der Abbau von RNA und es verbessern sich die Ergebnisse der RT bei der Herstellung von cDNA aus RNA [45,59,84].

Der RNase-Inhibitor RNase OUT[™] wurde in rekombinanten E. coli-Strängen exprimiert. Er besitzt eine hohe Affinität zur RNase A, B und C. Dadurch werden solche vorhandenen RNasen unterdrückt und die Zerstörung von RNA verhindert [7].

Für ein pH-Optimum von 8,3 stand ein 10xPCR-Puffer II aus KCl und Tris-HCl zur Verfügung, für die Stabilität der Enzymaktivität wurde MgCl₂ zum Ansatz hinzugegeben.

Hexamere bzw. ein Antisense-Primer waren notwendig, um als Primer an variablen Stellen der RNA zu fungieren und den Anfang für die reverse Transkription zu bilden.

Zur Bildung der cDNA wurden zu gleichen Teilen dNTP als dATP, dGTP, dTTP und dCTP benötigt.

Die Verhältnisse der verschiedenen Komponenten für jede gewonnene RNA-Probe können aus Tabelle 2 entnommen werden.

| Material | µl |
|-----------------------|-----------|
| MgCl ₂ | 4,00 |
| dNTP | 4,00 |
| PCR Puffer | 2,00 |
| Hexamere | 0,50 |
| RNAse-Inhibitor | 0,50 |
| Reverse Transkriptase | 0,25 |
| | 11,25 |
| Extrahierte RNA | 8,75 |
| Gesamtvolumen | 20,00 |

Tabelle 2: Ansatz für RT-PCR

Nach Fertigstellung der einzelnen Ansätze wurden diese bei 41° C 45 Minuten inkubiert und danach auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden sowie die Bildung von Hybriden und Sekundärstrukturen zu verhindern. Mit der nun vorhandenen cDNA konnte die eigentliche PCR durchgeführt werden.

3.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können Nukleinsäuren nach dem von K. Mullis beschriebenen Prinzip vervielfältigt werden (Abb. 5). Sie besteht aus drei Reaktionsschritten, die entsprechend wiederholt werden. Es werden eine DNA-Matrize, eine hitzestabile DNA-Polymerase als Enzym zur Vervielfältigung der Matrize, synthetisch hergestellte Primer als Starter für das Enzym, dNTP als Elemente für die neu zu synthetisierenden Stränge sowie ein geeignetes Puffersystem benötigt [33].

Dem eigentlichen Beginn der PCR wird eine 12-minütige Erwärmungsphase bei 95° C, der so genannte hot start, vorgeschaltet, während dem eventuell vorhandene Hybride getrennt werden sowie die besonders geschützte Polymerase (bei uns AmpliTaq Gold™) aktiviert und somit eine vorzeitige enzymatische Aktivität verhindert wird. Dadurch ist es möglich, die Reaktionsansätze bei Raumtemperatur vorzubereiten.

Im ersten Schritt der PCR erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95° C, wobei die DNA in zwei Einzelstränge aufgeteilt wird.

Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagert sich jeder Primer bei einer Temperatur von ca. 50° C (in Abhängigkeit des Temperaturoptimums der gelieferten Primer) an seinen jeweiligen DNA-Matrizenstrang an und fungiert dort als Starter für die Polymerase.

Während der Polymerisation, dem dritten Reaktionsschritt, beginnt die DNA-Polymerase von den Primern aus mit der Verdopplung beider DNA-Stränge, wobei nach dem zweiten Zyklus der entgegengesetzte Primer als Ende des zu produzierenden PCR-Produkts vorliegt. Ab dem 3. Zyklus der PCR wird nun der gesuchte Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Die Extension findet beim Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase (im Allgemeinen 72° C) statt.

Die so entstandenen Doppelstrangabschnitte dienen im nächsten Zyklus wieder als Ausgangsmatrizen. Mit jedem Zyklus wird so eine Verdopplung (2^n) des jeweiligen Ausgangsmaterials erreicht, was zu einem exponentiellen Anstieg (e^n) der gewünschten DNA-Abschnitte führt. Leider kann die Verdopplung nicht unendlich fortgeführt werden, da mit zunehmender Zyklenzahl sowohl die Primer- und Desoxynukleotidkonzentration als auch die Aktivität der DNA-Polymerase abnehmen. Die Effizienz nimmt also ab einem bestimmten Punkt mit jedem Zyklus ab. Eine optimale Zyklenzahl liegt je nach zugegebener Menge der Einzelkomponenten bei 25 bis 55. Früher wurde die Reaktion noch wesentlich stärker durch die Aktivitätsabnahme der DNA-Polymerase begrenzt [33]. Trotz Verwendung der heute üblichen thermostabilen Polymerasen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) kommt es bei einer wiederholten Erhitzung auf 95° C zu einem langsamen Aktivitätsverlust [47]. Wir setzten AmpliTaq Gold™ von Perkin Elmer für unsere PCR ein, durch deren Einsatz die Möglichkeit eines hot starts gegeben ist. Durch diesen wiederum kann auch eine Erhöhung der Zyklenzahl vorgenommen werden, um eine Zunahme der spezifischen Produkte bei geringer Ausgangsmenge zu erreichen [85]. Diese Möglichkeit nutzten wir bei der PCR für die E2-Region.

Zur Stabilisierung der Polymerase, aber auch zur Anlagerung der Primer an die Matrizen, ist eine geeignete Anzahl von Mg^{2+} -, K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Ionen notwendig. Diese werden mit dem 10xPCR-Puffer geliefert, der auch für einen gleich bleibenden pH-Wert sorgt.

Genau wie bei der RT werden Desoxynukleotide in gleichem Verhältnis zur Bildung der neuen DNA-Stränge benötigt.

Die Primer für den zu amplifizierenden Abschnitt wurden von uns mit Hilfe bekannter Nukleotidsequenzen von HCV-3a-Prototypen ausgewählt (siehe Abschnitt Primer und Material).

Für die Darstellung eines schematischen Ablaufs einer PCR im Thermocycler für die E2-Region des HCV wird auf Tabelle 3 verwiesen.

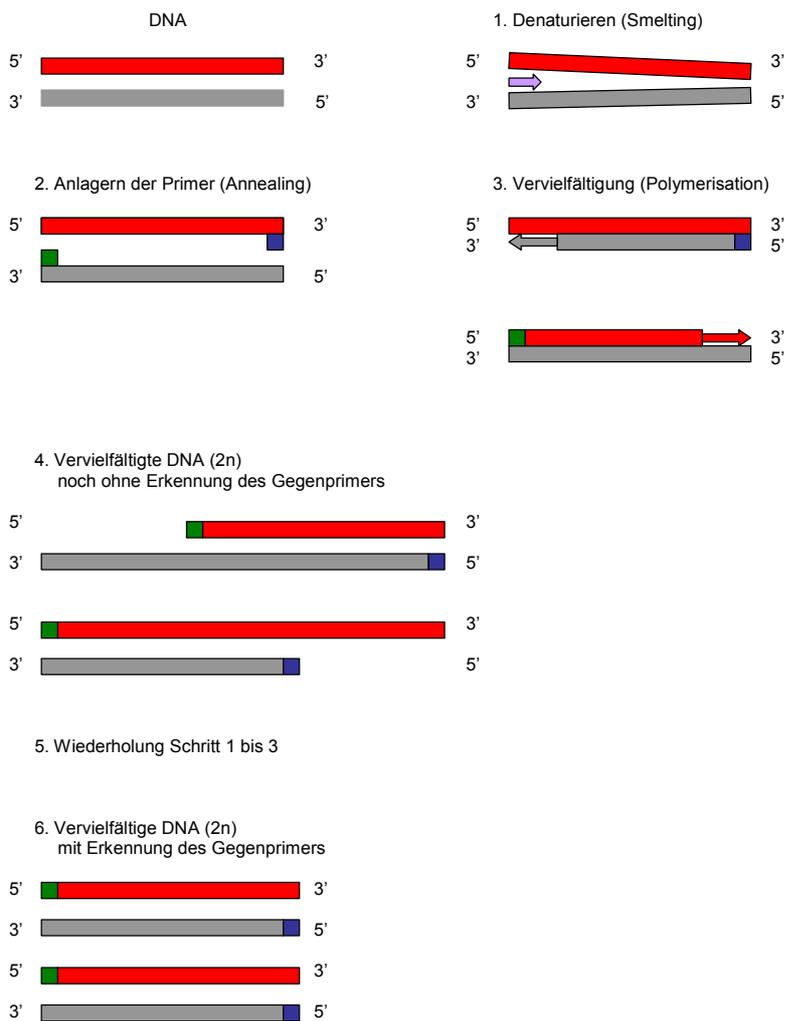


Abbildung 5: Schematische PCR zur Vervielfältigung von DNA

| | | | |
|------------------|-----------|---------|-----------|
| PCR | µl | | |
| Puffer | 4,0 | | |
| sense-Primer | 0,5 | | |
| antisense-Primer | 0,5 | | |
| DNTP | 1,0 | | |
| Aqua | 23,0 | | |
| Taq Gold | 1,0 | | |
| RT-Produkt | 20,0 | | |
| ges. Vol. | 50,0 | | |
| | | | |
| Cycler | 95°C | 12 min. | |
| | 95°C | 40 s | 55 Zyklen |
| | 50°C | 40 s | 55 Zyklen |
| | 72°C | 2 min. | 55 Zyklen |
| | 72°C | 10 min. | |

Tabelle 3: Schema für PCR der E2-Region

3.8.1. Nested-Polymerase-Ketten-Reaktion (nested-PCR)

Wir versuchten zuerst die interessierenden Abschnitte des NS5A-Proteins mit einer einfachen PCR zu amplifizieren, welche aber vermutlich aufgrund der Länge des PCR-Produkts als auch der bekannten Heterogenität der HCV-Isolate keine verwertbaren Ergebnisse lieferte. Deshalb entschlossen wir uns, eine nested-PCR zum Einsatz zu bringen. Die Ergebnisse mit dieser Methode waren gut verwertbar. Hierdurch wird die Sensitivität und Spezifität für den zu untersuchenden Genbereich erhöht. Erreicht wird dies durch den Einsatz von zwei Primerpaaren, die in zwei aufeinander folgenden PCR zum Einsatz kommen. Mit dem ersten Primerpaar wird ein größerer Genabschnitt um die interessierende Region ausgewählt und vervielfältigt. In der folgenden PCR wird das zweite Primerpaar eingesetzt. Dieses umfasst den gesuchten DNA-Abschnitt enger und lagert sich an Bereiche der vorher amplifizierten DNA an. Die so gewonnenen PCR-Produkte aus der 2. PCR können anschließend zur Sequenzierung weiter verarbeitet werden.

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die prozentual höhere Kontaminationsgefahr. Jedes Cup muss zweimal geöffnet werden, sowohl nach der RT als auch nach Beendigung der ersten PCR. Um eine Kontamination zu erkennen, wird deshalb immer ein Ansatz ohne DNA-Material, eine so genannte Negativprobe, mitgeführt.

Schema zur Durchführung der nested-PCR für die NS5A-Region des HCV siehe Tabelle 4.

| PCR I | µl | | | PCR II | µl | |
|---------------|-----------|---------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| Puffer | 4,0 | | | Puffer | 4,0 | |
| 3a5A3s | 0,5 | | | 3a5A20s | 0,5 | |
| 3a5A2a | 0,5 | | | 3a5A20a | 0,5 | |
| dNTP | 1,0 | | | dNTP | 1,0 | |
| Aqua | 23,0 | | | Aqua | 33,0 | |
| Taq Gold | 1,0 | | | Taq Gold | 1,0 | |
| RT-Produkt | 20,0 | | | PCR I | 10,0 | |
| ges. Vol. | 50,0 | | | ges. Vol. | 50,0 | |
| | | | | | | |
| Cycler | 95° C | 12 min. | | 95° C | 12 min. | |
| | 95° C | 40 s | 35 Zyklen | 95° C | 30 s | 35 Zyklen |
| | 50° C | 40 s | 35 Zyklen | 55° C | 40 s | 35 Zyklen |
| | 72° C | 2 min. | 35 Zyklen | 72° C | 1:30 min. | 35 Zyklen |
| | 72° C | 10 min. | | 72° C | 10 min. | |

Tabelle 4: Schema nested-PCR für die NS5A-Region

3.9. Gelelektrophorese

Alle Proben der NS5A-Region wurden in einem 1,8 %igen Agarosegel, die der E2-Region in einem 2 %igen Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid, in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt und mit dem DNA-Längenstandard-Marker VI (Boehringer Mannheim) verglichen. Die Ergebnisse wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und als Foto dokumentiert (Abb. 6 und 7).

Zur Herstellung des Agarosegels wird der entsprechende Anteil Agarose in 100 ml 0,5xTBE-Puffer aufgelöst und kurz aufgeköcht, bis eine klare Flüssigkeit entsteht.

Nach kurzer Abkühlung der Flüssigkeit und Hinzugabe von 2 µl Ethidiumbromid wird das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen und Plastikkämme zur Bildung der Startkammern eingesteckt, bevor es zur Abkühlung und Erstarrung stehen gelassen wird. In die erste Kammer wird der DNA-Längenstandard-Marker gegeben, in die nachfolgenden die zu untersuchenden Proben, inklusive der Negativprobe. Mit einer Spannung von 120 V und einem angelegten Strom von 125 mA werden die Proben im Gel über eine Stunde laufen gelassen. Danach ist eine Darstellung unter UV-Licht durch das in die DNA interkalierte und fluoreszierende Ethidiumbromid mit nachfolgender Fotodokumentation möglich.

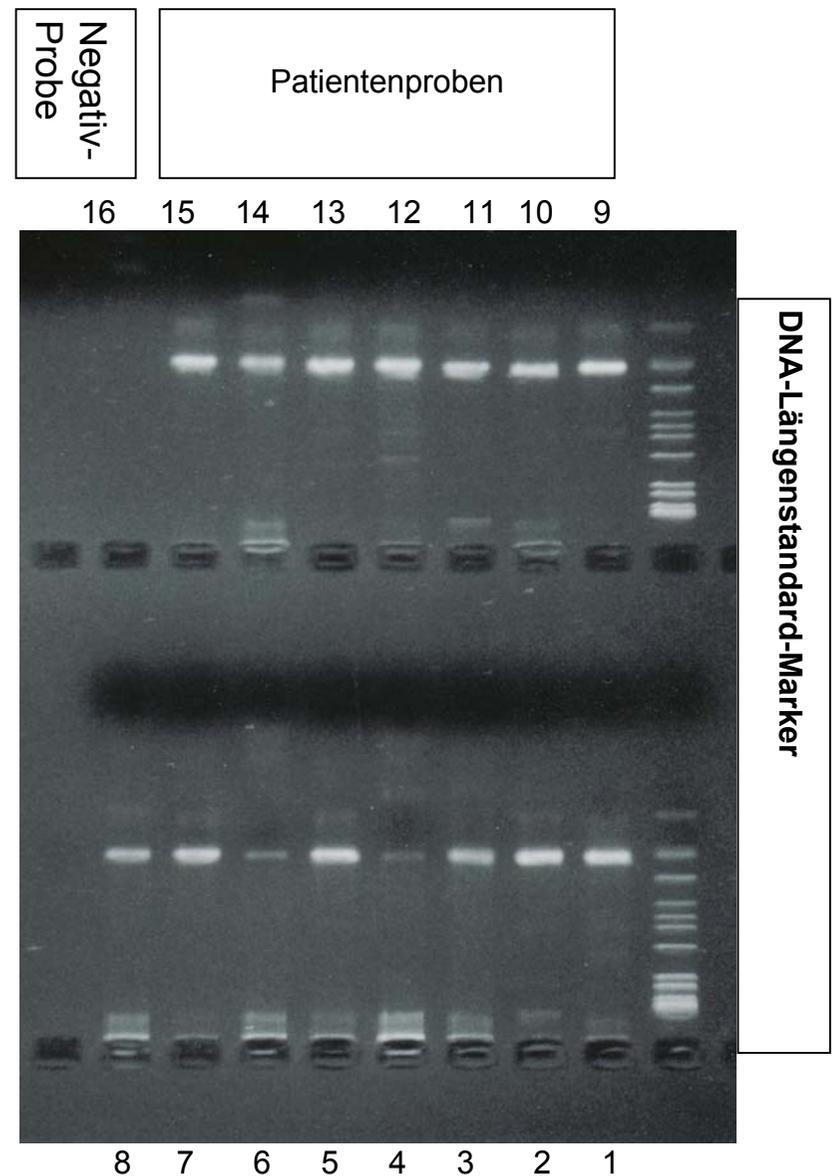
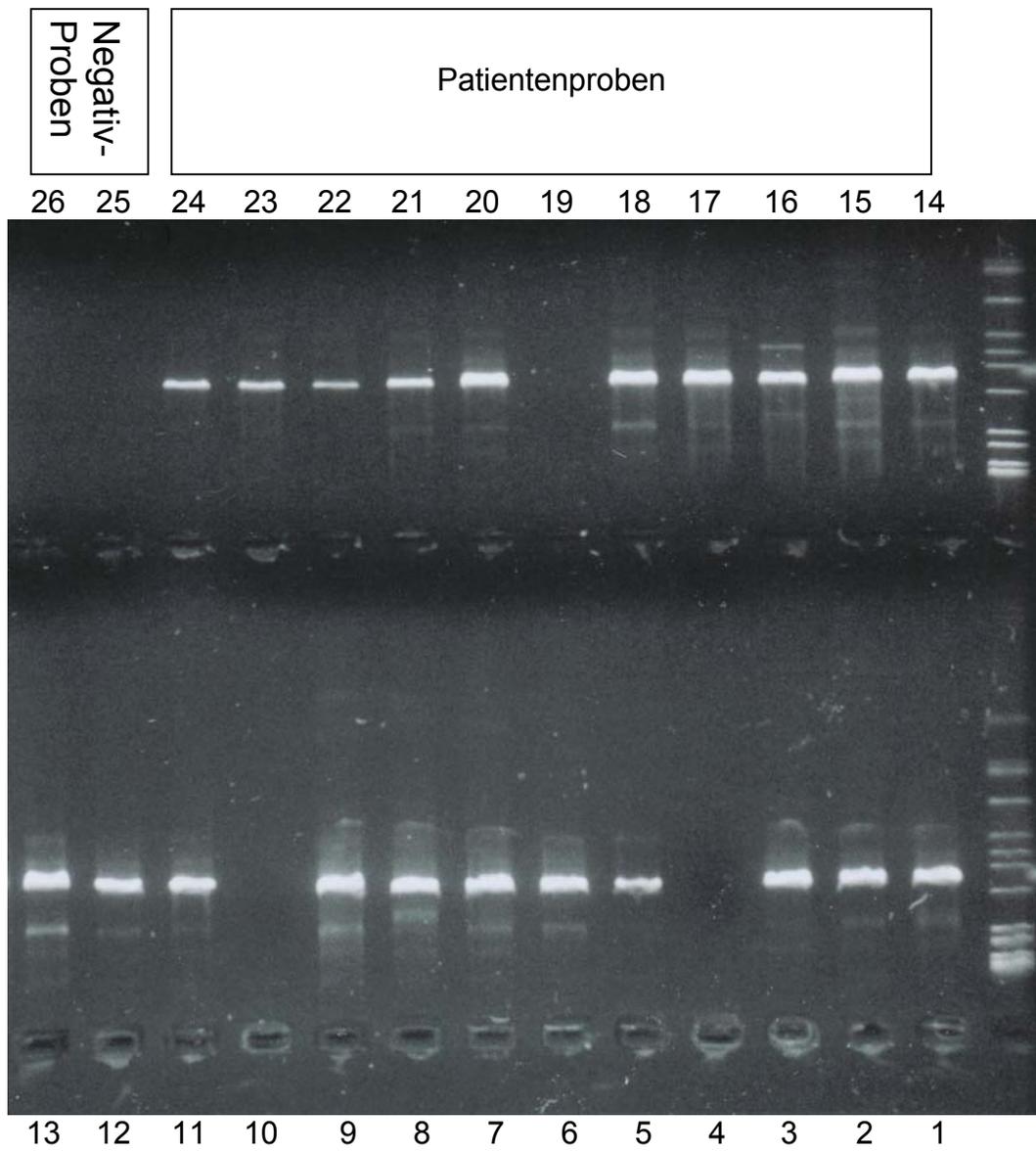


Abbildung 6 und 7: Fotos einer Gelelektrophorese unter UV-Licht nach RT-PCR der NS5A-Region links und der E2-Region rechts verschiedener Patienten

3.10. Primer

Primer bestehen aus kurzen Abfolgen von Nukleotiden (ca. 10 bis 30), die sich während des Annealings an komplementäre Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern. Sie dienen dort als Start- bzw. Endpunkt für die DNA-Polymerase. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von bekannten Sequenzen der HCV-Prototypen NZL1 [94] und HCV-K3a [119]. Dabei wurde auf die Hinweise von Gassen [33] und eigene Erfahrungen geachtet. Unsere Primer besitzen eine Länge von 17 bis 20 Basen, der C/G-Gehalt beträgt ca. 50 % und eine Folge von mehr als zwei G oder C aufeinander wurde weitestgehend vermieden. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass sie die zu untersuchenden Regionen sicher einschlossen.

Die Amplifikation der NS5A-Region wurde mit Hilfe der nested-PCR, wie oben beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden für die PCR I die Primer 3a5A3s (Position 6097-6113: 5'CAGTGGATGAACAGGCT3') und 3a5A2a (Position 7774-7790: 5'AAGGTAACCTTCTTCTG3') eingesetzt. Während der PCR II verwendeten wir die Primerpaare 3a5A20s (Position 6718-6737: 5'TTCTTYACTGAAGTGGATGG3') und 3a5A20a (Position 7267-7286: 5'GTTGGTGGTACATAATCCGG3') bzw. 3a5A21s (Position 7189-7208: 5'CCTCCCAAGTATCCTCCAGC3') und 3a5A21a (Position 7693-7712: 5'TTGCTGAGMGGYCTGATGGG3'). Anfängliche Amplifikationen mit Hilfe einer semi-nested-PCR wurden mit den Primern 3a5A5s (Position 6844-6860: 5'GAGCCAGAACCAGATGT3') und 3a5A2a (wie oben) sowie 3a5A5s/3a5A3a (wie oben bzw. Position 7333-7349: 5'CTTTTCCTCCGAGGAGG3') durchgeführt. Für die One Tube-PCR wählten wir das Primerpaar 3a5A6s (Position 6581-6605: 5'CACCCAACACTACTCGCGC3') und 3a5A5a (Position 6923-6944: 5'GGAGGGGACCCGCGCGCAAGAC3') aus. Die Positionsbestimmung erfolgte anhand der HCV-Prototypen NZL1 und HCV-K3a (siehe oben) [94,119]. Letztendlich gelang nur mit den Primerkombinationen 3a5A3s/3a5A2a und 3a5A20s/3a5A20a als nested-PCR die vollständige Amplifikation und nachfolgende Sequenzanalyse aller Patientenproben.

Für die Amplifikation der E2-Region genügte eine einfache PCR. Dabei kam das Primerpaar 3aE2-1s (Position 2233-2252: 5'TTGTTCAAGGTGAGGATGTT3') und 3aE2-1a (Position 2455-2474: 5'CCAARGCCATAAAGGTATTG3') zum Einsatz. (Positionsbestimmung anhand der HCV-Prototypen HCV-K3a und NZL1, siehe oben)

[94,119]. Die Primer wurden von Biospring, Frankfurt, synthetisiert, wo auch die Ermittlung der Temperaturoptima bzw. der Schmelzpunkte erfolgte.

3.11. Sequenzanalyse

Bevor eine Sequenzierung stattfinden kann, müssen die erhaltenen PCR-Produkte gereinigt werden. Alle für die PCR hinzugegebenen Komponenten können die Sequenzierung bzw. die spätere Analyse der DNA stören, z. B. verbliebene Primer, Nukleotide, Polymerasen oder Puffersalze.

Die Reinigung der PCR-Produkte konnte mit einem vorgefertigten Kit von Amicon (Microcon 100) vorgenommen werden. Dabei wird eine hydrophile Membran zum Einsatz gebracht, die in der Lage ist, DNA ab einem bestimmten spezifischen Gewicht zurückzuhalten und alle leichteren Anteile eines Gemisches zu filtrieren. Durch Wenden der Membran kann dann die gereinigte DNA mittels Zentrifugation in einem neuen Cup aufgefangen und zur weiteren Verarbeitung gelagert werden [67]. Die so gereinigte DNA muss nochmals mit Hilfe einer speziellen PCR, getrennt mit sense- und antisense-Primern, vermehrt werden. Hierdurch kann eine Kontrolle der Einzelstränge untereinander stattfinden. Die Sequenz-PCR wird mit einem Gemisch aus normalen dNTP und didesoxyNTP durchgeführt. Letztere enthalten zusätzlich für jede Base ein unterschiedlich fluoreszierendes Molekül. Die didesoxyNTP haben die Eigenschaft einen Strangabbruch zu bewirken. Zusammen mit den normalen dNTP kommt es in der Sequenz-PCR zur Bildung von allen denkbaren unterschiedlichen Nukleotidlängen des gesuchten PCR-Produkts. Die enthaltenen fluoreszierenden Nukleotide (BigDye™ Deoxyterminator RR Mix) jeweils am Ende der unterschiedlich langen PCR-Produkte können von der eingebauten Kamera des Sequenzanalysegerätes (310 DNA Sequenzer) während der Passage in einer Kapillargelelektrophorese erkannt werden. Sequenz-PCR-Protokoll siehe Tabelle 5.

Für eine exakte Sequenzanalyse im Sequenziergerät müssen die erhaltenen PCR-Produkte, wie nach PCR II, von überschüssigen Materialien befreit und denaturiert werden. Dafür wird Ethanol 100 % und Template Suppressions Reagens (Perkin Elmer, Applied Biosystems) verwendet. Überschüssige Flüssigkeit mit zerstörten Materialien wird abpipettiert. Die präparierten Cups können mit je einem amplifizierten DNA-Einzelstrang im Sequenziergerät analysiert und als lesbare Sequenzen ge-

druckt werden. Die Analyse im Gerät erfolgt nach Angabe des Herstellers (Perkin Elmer, ABI Prism™) mit folgenden Parametern:

| | | | |
|----------------|---------------------------|---------------------|--------|
| Injektionszeit | 70-80 s | Injektions-Spannung | 2,0 kV |
| Laufspannung | 15,0 kV | Lauftemperatur | 50 ° C |
| Laufzeit | an Sequenzlänge angepasst | | |

| | | | |
|---------------------------------------|---------|--------|-----------|
| Sequenz-PCR | | | |
| PCR-Gemisch mit di-desoxyNTP und dNTP | 4,0 µl | | |
| PCR-Produkt | 15,0 µl | | |
| Primer sense bzw. anti-sense | 0,5 µl | | |
| Gesamt | 19,5 µl | | |
| | | | |
| Cycler | 95° C | 10 s | |
| | 55° C | 2 min. | 35 Zyklen |
| | 60° C | 4 min. | |
| | | | |

Tabelle 5: Schema für Sequenz-PCR der Einzelstränge

Durch die ausgedruckten Sequenzen ist es möglich, für jede Probe die exakten Nukleotidfolgen zu lesen und in eine Aminosäuresequenz zu übersetzen. Anhand eines Vergleichs mit HCV-Prototypsequenzen bzw. einer aus allen erhaltenen Sequenzen abgeleiteten Konsensussequenz können eventuelle Mutationen erkannt werden.

3.12. Phylogenetische und Konformationsanalyse

Die Aufstellung der Aminosäuresequenzen und die Berechnung der Konsensussequenz (cons) wurde durchgeführt, indem die CLUSTAL-X1.64b-Software benutzt wurde [111]. Die phylogenetischen Bäume mit Sequenzen, die aus den Isolaten der Patienten gewonnen wurden, wurden nach der Methode von Saitou und Nei [92] und mit Hilfe des Programmes Treecon für Windows (Version 1.3b) konstruiert [114].

Bootstrap (1000 Nachbildungen) wurde als ein pseudoempirischer Test in Bezug auf die Zuverlässigkeit der berechneten Baumstrukturen benutzt [25]. Eine Identitätsproteingewichtsmatrix wurde eingesetzt, um die evolutionäre Entfernung abzuschätzen und um multiple Substitutionen zu korrigieren, wurde die Kimura-Korrektur herangezogen [53]. Bei der phylogenetischen Analyse handelt es sich um eine Bestimmung der genetischen Verwandtschaft zwischen den einzelnen erhaltenen HCV-Sequenzen der verschiedenen Patienten. Dabei wird jeweils zwischen zwei HCV-Sequenzen von Position zu Position jede Aminosäure verglichen und abschließend die prozentuale Verwandtschaft (identische bzw. unterschiedliche Aminosäuren) angegeben (0 %: vollständig gleich, 100 %: vollständig verschieden).

Die Sekundärstruktur der resultierenden Proteine der Sequenzen wurde mit der Doppelvorhersagemethode von Deléage und Roux [16] vorhergesagt, die in die ANTHEPROT V2.0-Software eingebaut war [34]. Diese Methode ist eine Kombination von Proteinklassenvorhersagen nach Nakashima et al. [70] sowie Chou und Fasman [13]. Mehrere Aufstellungen von vorhergesagten Sekundärstrukturen wurden vorgenommen und eine Identitätsvergleichsmatrix berechnet, wobei für beide CLUSTAL X1.64b [111] benutzt und ein Baum auf der Basis von Unterschieden der Sekundärstruktur der Proteine mit njplot gezeichnet wurde [81]. Bei der benutzten Methode kommen verschiedene Faltungsmöglichkeiten der Aminosäuren vor: alfa-Helix, beta-Faltblatt, Schleife und Drehung.

3.13. Datenpräsentation

Klinische und biochemische Charakteristika von Patienten wurden als mittlere Standardabweichung oder Median und Range ausgedrückt. P-Werte von $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Die Verteilung von fortlaufenden Variablen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die NS5A-Region (Kodon 2144 bis 2300, entsprechend NZL1) einschließlich der ISDR und der PKR-Bindungsdomäne (Kodon 2215 bis 2280, entsprechend NZL1) und ihren Nachbarregionen von Hepatitis C-Isolaten aus 33 Patienten, die eine chronische Infektion mit dem Subtyp 3a besaßen, untersucht. Außerdem wurde die PePHD-Region (Kodon 665 bis 676, entsprechend NZL1) des HCV-E2-Gens mit ihren Nachbarregionen (638 bis 704, entsprechend NZL1) sequenziert und ebenso wie die NS5A-Sequenz im Hinblick auf das virologische Therapieansprechen analysiert.

Die Untersuchung dieser beiden Regionen fand aufgrund der Hypothese statt, dass Mutationen innerhalb der NS5A-Region, insbesondere zwischen Kodon 2209 und 2274 (entsprechend HCV-J [49] als ISDR mit kompletter PKR-Bindungsdomäne in 1b-Isolaten) mit dem Therapieansprechen auf Interferon korrelieren [23]. Des Weiteren wurde die Hypothese geäußert, dass ein hot spot an Stelle 2161 (entsprechend NZL1) mit einem Aminosäurewechsel von T zu A bzw. V eine Korrelation mit dem Therapieansprechen aufweist [28]. Um die Vermutung zu untersuchen, dass auch die beschriebene PKR/E2-Interaktion und durch eventuelle Mutationen in diesem Bereich das virologische Therapieansprechen beeinflusst werden könnte, wurde die entsprechende E2-Region mit der PePHD (Kodon 665 bis 676, entsprechend NZL1) ebenfalls analysiert [108].

4.1. Die Aminosäuresequenz der E2-Region

Die Aminosäuresequenz des karboxyterminalen Teiles des HCV-E2-Gens ist hoch konserviert. Die Konsensussequenz (cons), die durch Sequenzvergleich mit Hilfe von CLUSTAL X1.64b [111] von allen 33 Patientenisolaten gewonnen wurde, und die Prototypsequenz NZL1 von HCV 3a [94] zeigen zwischen Kodon 638 und 704 (PePHD und Nachbarregionen) eine völlige Übereinstimmung. Im Vergleich mit dem HCV-3a-Prototyp HCV-K3a [119] wurde nur eine Aminosäuremutation (I660L) gefunden (Abb. 8).

Innerhalb der PePHD des HCV-E2-Gens (665 bis 676, entsprechend NZL1) besaßen die Isolate der SR-Patienten im Mittel 0,5 Mutationen (Range 0-2), die der ETR-

Patienten 0,2 (Range 0-1) und die der NR-Patienten 0,2 Mutationen (Range 0-1) im Vergleich zur Konsensussequenz (Abb. 8). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen SR gegen ETR, SR gegen NR und SR gegen ETR + NR waren statistisch nicht signifikant (Tab. 7).

Die Sequenzanalysen des kompletten karboxyterminalen Teiles des HCV-E2-Gens (Kodon 638 bis 704, entsprechend NZL1) zeigten im Vergleich zur Konsensussequenz im Mittel 1,3 (Range 0-4) Mutationen bei SR-Patienten, 0,7 (Range 0-3) Mutationen bei ETR-Patienten und 0,7 (Range 0-2) Mutationen bei NR-Patienten, wiederum ohne statistische Signifikanz (Tab. 7/Abb. 8). Die Vergleiche der 33 Patientensequenzen mit den Prototypen NZL1 bzw. HCV-K3a zeigten ähnliche Ergebnisse (Abb.8).

Beim Vergleich der Sequenzen der E2-Region von je zwei ETR- und zwei NR-Patienten vor und nach Therapie zeigten sich keinerlei Veränderungen innerhalb der untersuchten Abschnitte (Abb. 9).

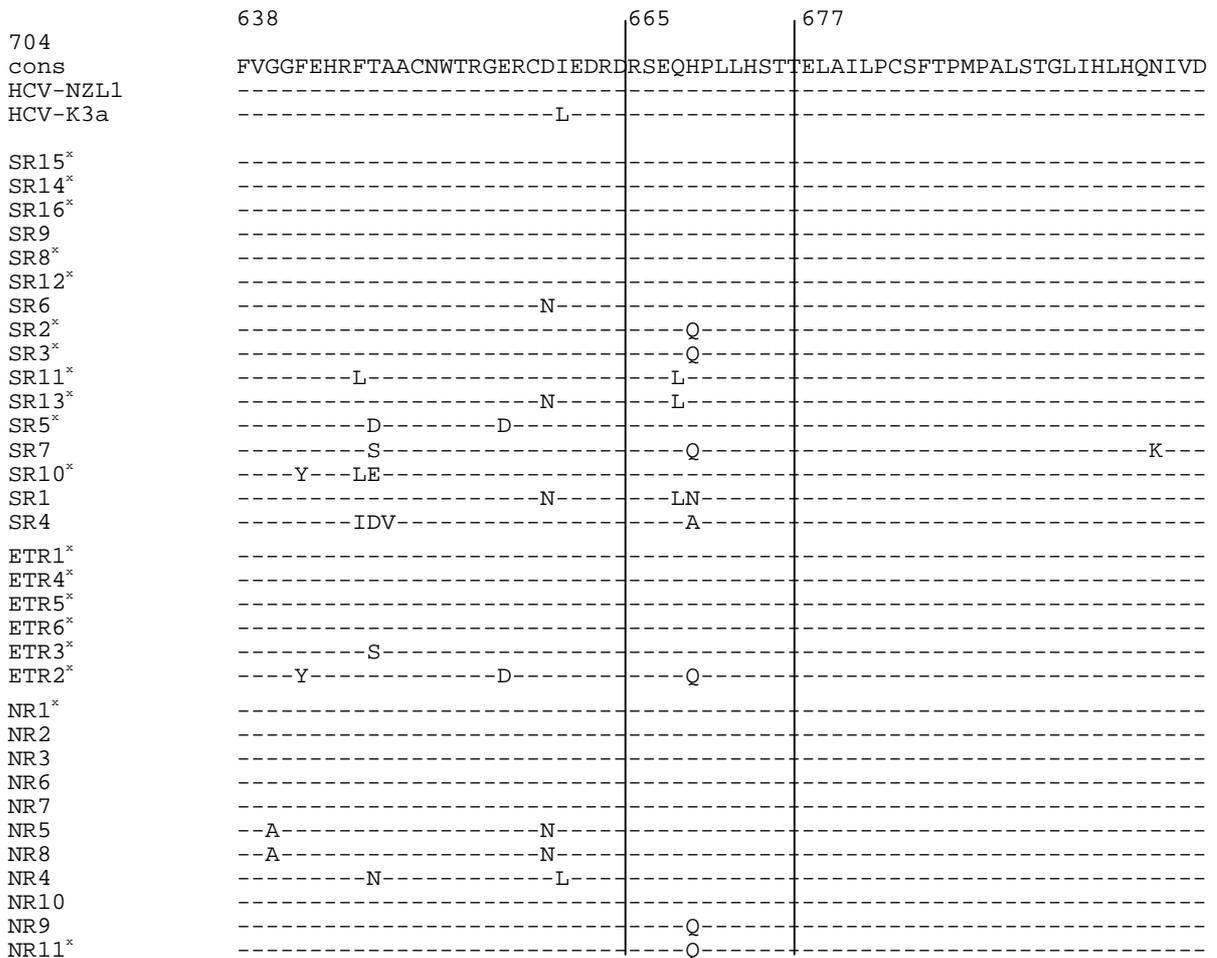


Abbildung 8: Sequenzvergleich der E2-Region 638 bis 704 aller untersuchten Patienten mit der Konsensussequenz cons. Als Referenz sind die HCV-3a-Prototypsequenzen von HCV-NZL1 und HCV-K3a mit angegeben. Kreuze hinter den Patientennummern zeigen eine Therapie mit Interferon und Ribavirin an, während die übrigen Patienten eine Interferon-Monotherapie erhielten. Horizontale Striche stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz. Die vertikalen Begrenzungen zeigen die Lokalisation der PePHD an.

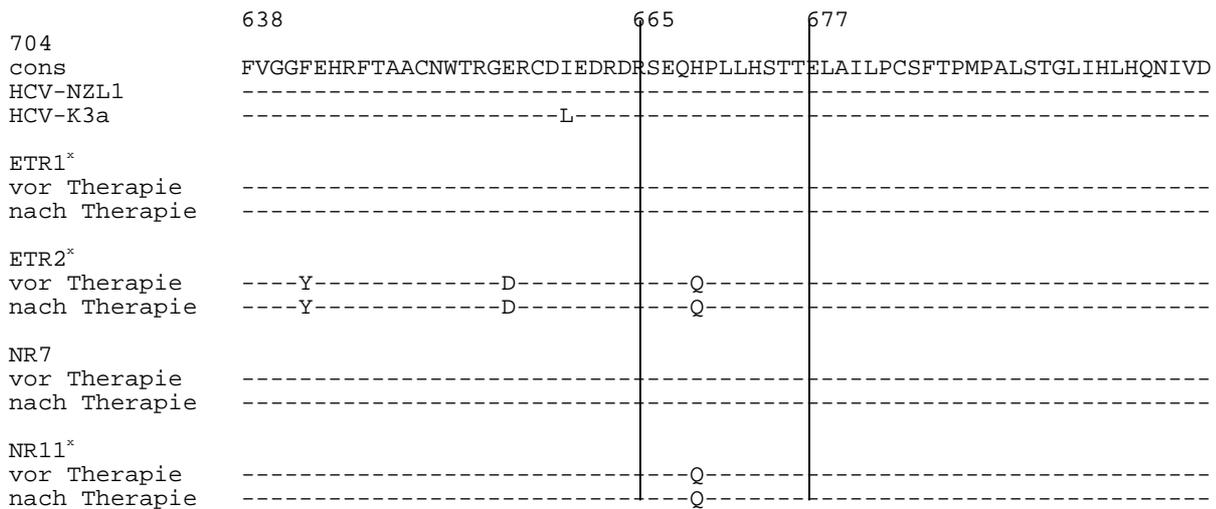


Abbildung 9: Sequenzvergleich der E2-Region zwischen Kodon 638 und 704 ausgewählter Patienten vor und nach Therapie mit den HCV-3a-Prototypsequenzen bzw. der Konsensussequenz. Die vertikalen Linien zwischen Kodon 665 und 676 begrenzen die PePHD. Kreuze hinter den Patientennummern zeigen eine Therapie mit Interferon und Ribavirin an, während die übrigen Patienten eine Interferon-Monotherapie erhielten. Horizontale Striche stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz.

4.2. Die Aminosäuresequenz der NS5A-Region

Die Aminosäuresequenzen der NS5A-Region (Kodon 2144-2300, entsprechend NZL1) mit dem hot spot bei 2161, mit der kompletten PKR-Bindungsdomäne (Kodon 2215 bis 2280) sowie mit der darin enthaltenen ISDR (Kodon 2215 bis 2254) werden in Abbildung 10 gezeigt.

Innerhalb der ISDR (Kodon 2215 bis 2254) waren die Sequenzen der Prototypen NZL1 und HCV-K3a identisch zur Konsensussequenz. Die Unterschiede zwischen der durchschnittlichen Anzahl von Mutationen bei SR-Patienten (0,4; Range 0-2), bei ETR-Patienten (0,3; Range 0-1) und NR-Patienten (0,5; Range 0-2) waren im Vergleich nicht statistisch signifikant (Abb. 10).

Bei der Ausdehnung der Analyse auf die komplette PKR-Bindungsregion (Kodon 2215 bis 2280, entsprechend NZL1) zeigten sich drei Aminosäureunterschiede zwischen NZL1 und der Konsensussequenz: I2258V, A2272V und L2274P sowie ein Aminosäureaustausch zwischen HCV-K3a und der Konsensussequenz: V2276A (Abb. 10). Innerhalb der PKR-Bindungsregion war die durchschnittliche Anzahl von

Mutationen im Vergleich zur Konsensussequenz 1,6 (Range 0-4) für SR-Patienten, 1,0 (Range 0-2) für ETR-Patienten und 1,6 (Range 0-3) für NR-Patienten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht statistisch signifikant (Abb. 10/Tab. 7). Keine Mutation korrelierte spezifisch mit dem virologischen Therapieansprechen. Allerdings wurden Aminosäuremutationen an Position 2269 (T2269P, A oder S) häufiger in Isolaten von Patienten mit SR (7 von 16) im Vergleich zu Isolaten von Patienten mit ETR oder NR (3 von 17) entdeckt. Anders war es an Position 2266, dort ist ein Aminosäureaustausch von R nach K bei 4 von 11 NR, aber keine bei ETR- oder SR-Patienten beobachtet worden. Der Vergleich der Isolate mit den Prototypsequenzen NZL1 und HCV-K3a zeigte vergleichbare Ergebnisse (Abb. 10).

Innerhalb der gesamten untersuchten NS5A-Region (Kodon 2144 bis 2300) wurden je zwei zusätzliche Aminosäureveränderungen zwischen der Konsensussequenz sowie den Prototypsequenzen NZL1 und HCV-K3a (N2158H und A2161T sowie K2144R und D2150E) gefunden (Abb. 10). Im Vergleich zur Konsensussequenz lag hier die mittlere Anzahl von Mutationen bei SR 3,8 (Range 2-6), ETR 4,2 (Range 1-6) und NR 3,6 (Range 1-7) (Tab. 7). Die Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben aber wiederum keine statistische Signifikanz.

Der Vergleich der HCV-3a-Prototypen HCV-K3a und NZL1 an Position 2161 zeigt Threonin bei NZL1 und Alanin bei HCV-K3a. In unserer Studie wurde Alanin bei Position 2161 in 21 Isolaten gefunden, welches somit die Konsensusaminosäure ergab. Außerdem zeigte sich ein Aminosäurewechsel von Alanin zu Valin an Position 2161 bei 10 Isolaten. Aber weder die Anwesenheit von Alanin, noch die von Valin korrelierte mit der virologischen Therapieantwort.

Die Hyperphosphorylationsstellen wurden in der Nähe von der vermutlichen ISDR-Region bei Kodon 2197, 2201 und 2204, entsprechend HCV-J [49], beschrieben [107]. An diesen Positionen (2203, 2207 und 2210, entsprechend NZL1) wurden keine Mutationen bei den HCV-Isolaten der 33 untersuchten Patienten im Vergleich zur Konsensussequenz oder zu den Prototypsequenzen HCV-K3a und NZL1 entdeckt (Abb. 10).

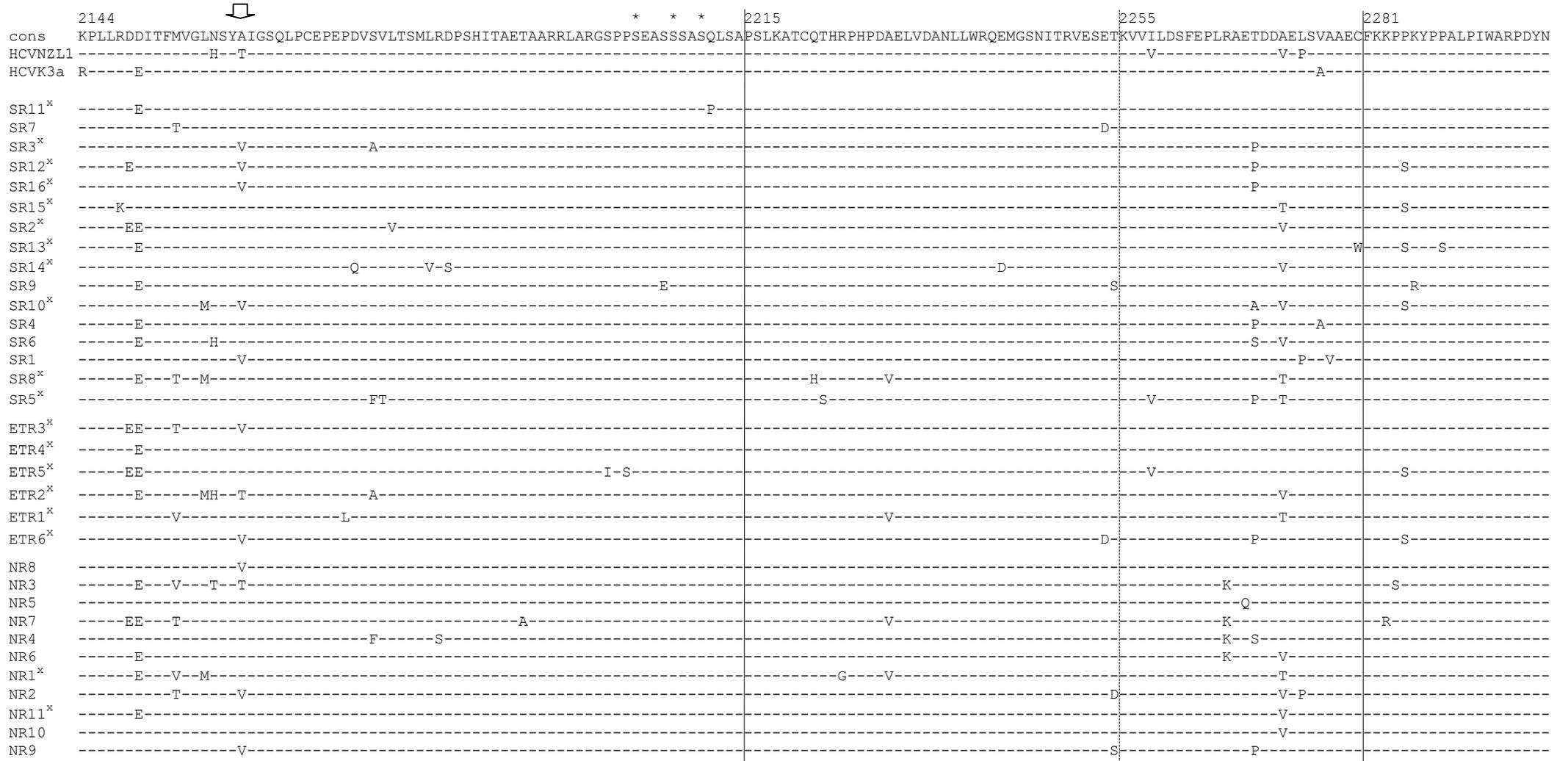


Abbildung 10: Sequenzvergleich der untersuchten Patienten und der Prototypsequenzen bzw. der Konsensussequenz zwischen Kodon 2144 und 2300. Die vertikalen Linien zwischen Kodon 2215 und 2254 zeigt die ISDR, zwischen 2215 und 2280 die PKR-Bindungsregion an. Der Pfeil kennzeichnet den hot spot an Position 2161, Sterne kennzeichnen die Hyperphosphorylierungsstellen an Position 2203, 2207 und 2210. Kreuze hinter den Patientennummern zeigen eine Therapie mit Interferon und Ribavirin an, während die übrigen Patienten eine Interferon-Monotherapie erhielten. Horizontale Striche stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz.

4.3. Virämie vor Therapie

Die Virämie vor Behandlungsbeginn war bei Patienten, deren Isolate Mutationen innerhalb des E2-Gens aufwiesen, im Durchschnitt geringer als bei Patienten, deren Isolate denen der Konsensus- oder der Prototypsequenzen entsprachen. Bei Patienten, die mehr als vier Mutationen innerhalb der NS5A-Region aufwiesen, war die Virämie vor Therapie gegenüber denen, die nur eine bis vier Mutationen zeigten, geringer. Die Unterschiede erreichten aber bei beiden Vergleichen keine statistische Signifikanz (siehe Tab. 6).

| | Anzahl der Mutationen | Patienten N | Viruslast vor Therapie (Kopien/ml) ¹ |
|-------------------------|-----------------------|-------------|--|
| E2 (638-704) | 0 | 16 | 5,5x10 ⁶ (0,001-49x10 ⁶) |
| | 1-2 | 13 | 2,9x10 ⁶ (0,01-7,7x10 ⁶) |
| | >2 | 4 | 0,6x10 ⁶ (0,1-1,0x10 ⁶) |
| NS5A (2144-2300) | 1 | 4 | 2,6x10 ⁶ (0,02-7,5x10 ⁶) |
| | 2-4 | 19 | 6,0x10 ⁶ (0,01-49x10 ⁶) |
| | >4 | 10 | 0,5x10 ⁶ (0,001-2,9x10 ⁶) |

¹ Mittelwert, in Klammern kleinster und größter Wert

Tabelle 6: Vergleich HCV RNA-Titer vor Therapie und Anzahl der Mutationen innerhalb der PePHD mit ihren angrenzenden Regionen und der PKR-Bindungsregion mit ihren Nachbarregionen

| | Mittlere Mutationenanzahl (min-max) | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| | SR (n=16) | ETR (n=6) | NR (n=11) |
| E2 gesamt (638-704) | 1,3 (0-4) | 0,7 (0-3) | 0,7 (0-2) |
| E2 PePHD (665-676) | 0,5 (0-2) | 0,2 (0-1) | 0,2 (0-1) |
| NS5A gesamt (2144-2300) | 3,8 (2-6) | 4,2 (1-6) | 3,6 (1-7) |
| NS5A PKR-BR (2215-2280) | 1,6 (0-4) | 1,0 (0-2) | 1,6 (0-3) |
| NS5A ISDR (2215-2254) | 0,4 (0-2) | 0,3 (0-1) | 0,5 (0-2) |

Tabelle 7: Anzahl der Mutationen innerhalb der verschiedenen E2- und NS5A-Regionen

4.4. Phylogenetische Analyse der E2- und NS5A-Sequenzen

Die evolutionären Abstandsberechnungen, die auf den E2- und NS5A-Sequenzen (Kodon 638-704 bzw. 2144-2300) der untersuchten Patienten basieren, wurden zur phylogenetischen Analyse herangezogen und mit Hilfe des Programmes Treecon für Windows als Bäume aufgezeichnet [92,114]. Hierbei wird die Nähe der Verwandtschaft durch die Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuresequenzen bestimmt und im phylogenetischen Baum als prozentuale Distanz angegeben. Dabei gilt, je länger die horizontale Linie, desto entfernter die Verwandtschaft. Zur Berücksichtigung von Wahrscheinlichkeiten für Nukleotidaustausche in der vergangenen Zeit wurde die Korrekturmethode nach Kimura verwendet [53]. Für die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der gemachten Berechnungen wurde Bootstrap eingesetzt [34]. Die Patienten wurden entsprechend ihrer virologischen Antwort auf die Behandlung wiederum in drei Gruppen eingeteilt: SR, ETR und NR. Es ergab sich kein einheitlicher Cluster für die verschiedenen Gruppen. Die Isolate der SR-, ETR- und NR-Patienten waren überall auf dem jeweiligen phylogenetischen Baum verteilt (Abb. 11 und 12).

4.5. Konformationsanalyse der E2- und NS5A-Region

Um die potenziellen Unterschiede zwischen therapiesensitiven und -resistenten HCV-Isolaten zu untersuchen, wurde eine Konformationsanalyse der Sekundärstrukturen durchgeführt. Die Sekundärstruktur für das E2- bzw. NS5A-Protein (Kodon 638-704 bzw. 2144-2300) wurde mit der Doppelvorhersagemethode von Deléage und Roux und Unterstützung der ANTHEPROT 2.0-Software berechnet [16,34]. Bei dieser Methode sind vier Möglichkeiten für jede Aminosäure gegeben: α -Helix (H), β -Faltblatt (E), Drehung (T) und Schleife (C). Die Mehrzahl der Aminosäuremutationen, die bei den Isolaten der SR-, ETR- und NR-Patienten gefunden wurden, waren konservativ (Austausch von Aminosäuren mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften) innerhalb von E2 (77 %, 75 % bzw. 100 %) und innerhalb von NS5A (83 %, 76 % bzw. 79 %). Einige Mutationen von hydrophoben Aminosäuren, die hauptsächlich im hydrophoben Kern der resultierenden Proteine lagen, wurden innerhalb des E2- und des NS5A-Proteins beobachtet mit: SR 12 %, ETR

12 % und NR 13 % bzw. SR 5 %, ETR 25 % und NR 0 %. Innerhalb des E2-Proteins wurden Mutationen bei geladenen und polaren Aminosäuren, die sich in der vermutlich hydrophilen Oberfläche des Proteins befinden, ausschließlich bei SR-Patienten gefunden (SR 1, 11, 13: Q668L und SR 4: H669A). Diese Mutationen waren in der stark hydrophilen Region des E2-Proteins zwischen Kodon 661 und 678, die die beschriebene PePHD beinhaltet, zu finden (Abb. 8). Die Mutationsrate in der NS5A-Sequenz für polare und geladene Aminosäuren war zwischen den SR- (5 %), ETR- (12 %) und NR-Isolaten (8 %) ähnlich. Keine der spezifischen Mutationen korrelierte aber mit dem virologischen Therapieansprechen.

Um die Beziehungen der verschiedenen Isolate untereinander auf Basis ihrer Sekundärstrukturen zu zeigen, wurden anhand einer Identitätsvergleichsmatrix Bäume für die E2- und die NS5A-Region gezeichnet (Abb. 13 und 14). Die Distanz zeigt wiederum die prozentuale Nähe/Entfernung der Verwandtschaft an. Die E2-Isolate von SR-Patienten zeigten eine größere Variabilität im Vergleich zu den Isolaten der ETR- und NR-Patienten. Allerdings wurden weder innerhalb der E2- noch der NS5A-Region einheitliche Gruppen von Isolaten aus SR-, ETR- oder NR-Patienten in den gezeichneten Bäumen beobachtet.

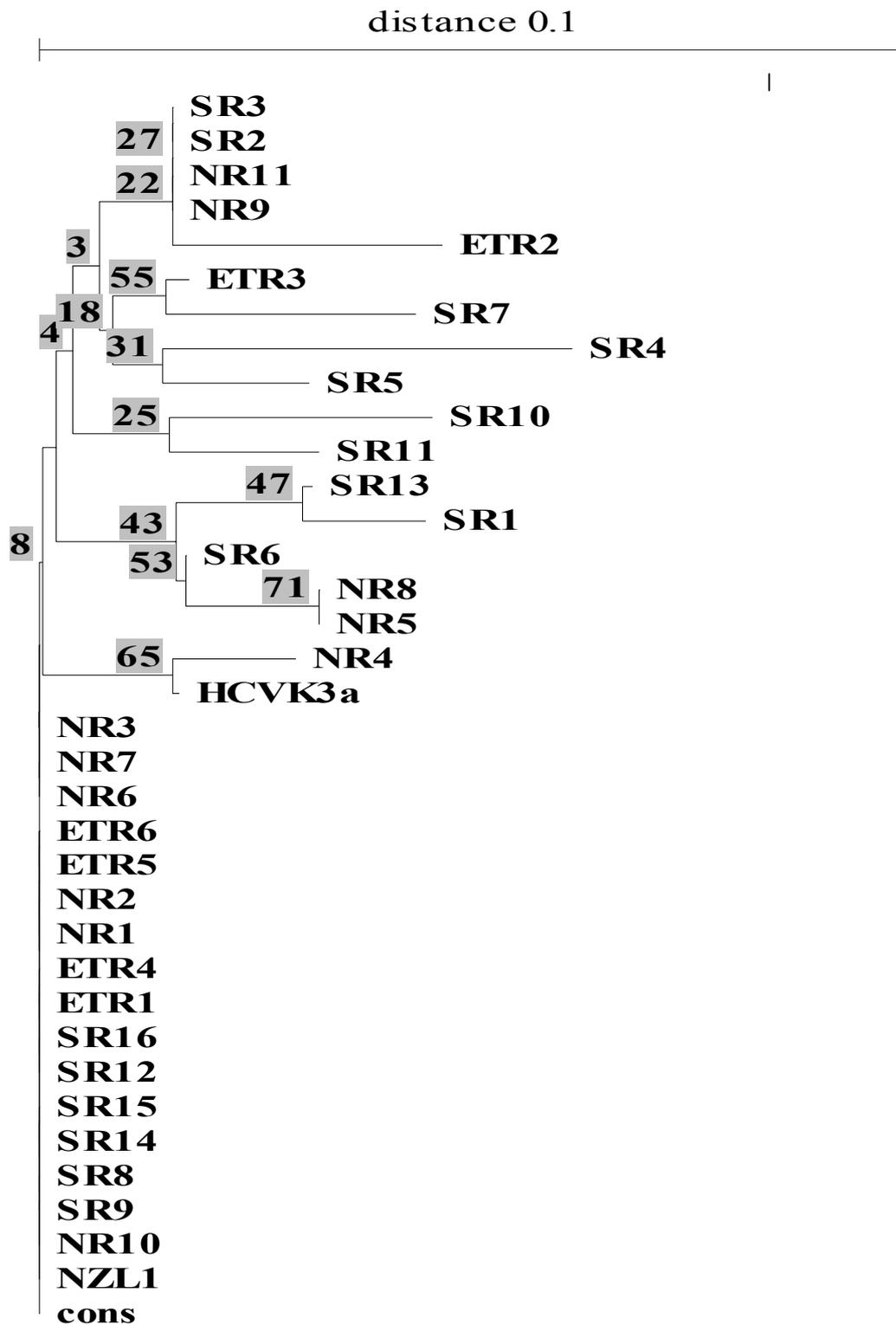


Abbildung 11: Phylogenetischer Baum der E2-Region aus allen 33 Patienten sowie der Prototypen HCV-K3a, NZL1 und der Konsensussequenz. Die angegebenen Knotennummern entsprechen den Werten der Bootstrap-Analyse und geben die prozentuale Häufigkeit der Aufzweigung an der entsprechenden Stelle bei den verschiedenen Läufen der Bootstrap-Analyse wieder.

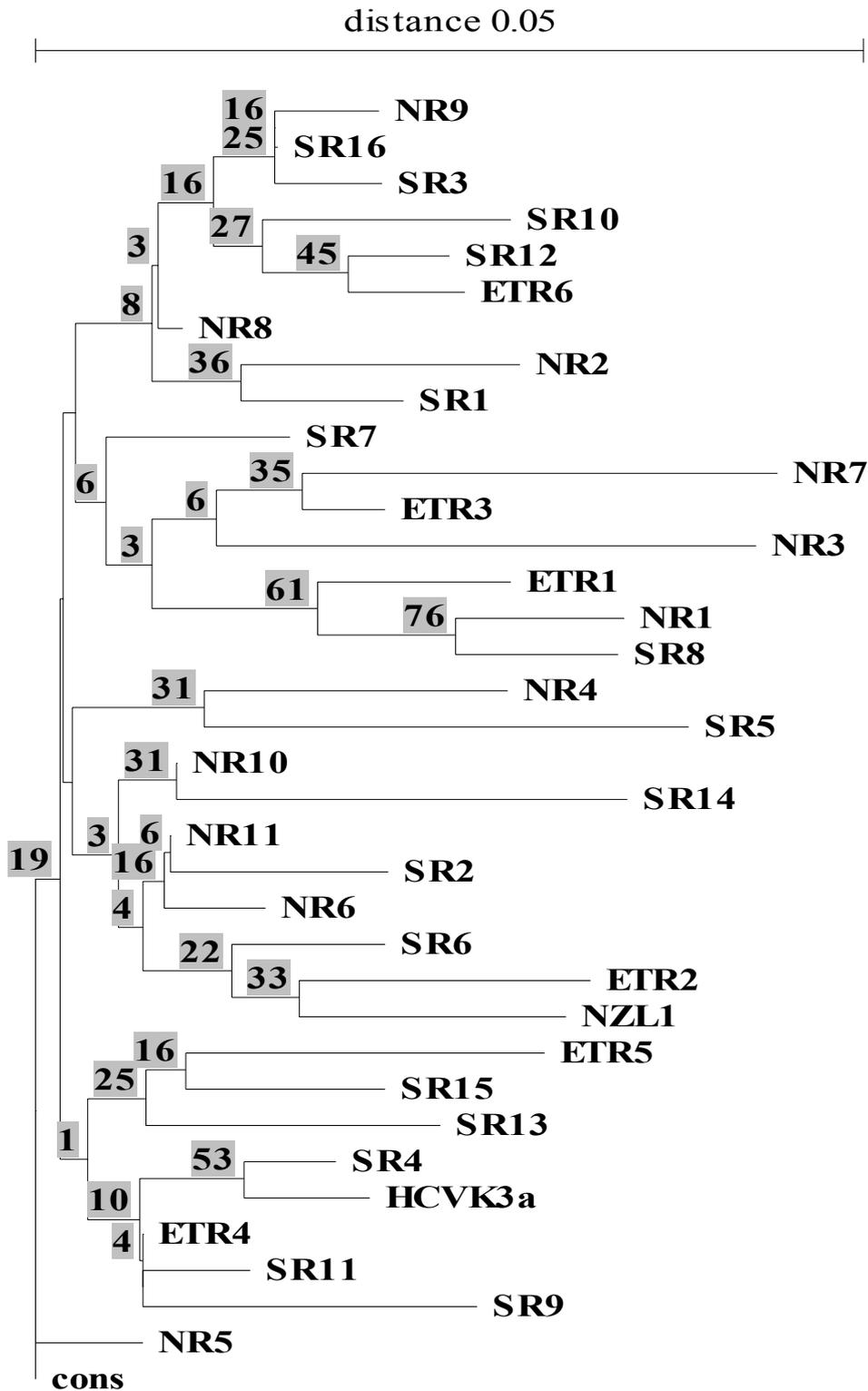


Abbildung 12: Phylogenetischer Baum der NS5A-Region aller 33 Patienten sowie der Prototypen HCV-K3a, NZL1 und der Konsensussequenz. Die angegebenen Knotennummern entsprechen den Werten der Bootstrap-Analyse und geben die prozentuale Häufigkeit der Aufzweigung an der entsprechenden Stelle bei den verschiedenen Läufen der Bootstrap-Analyse wieder.

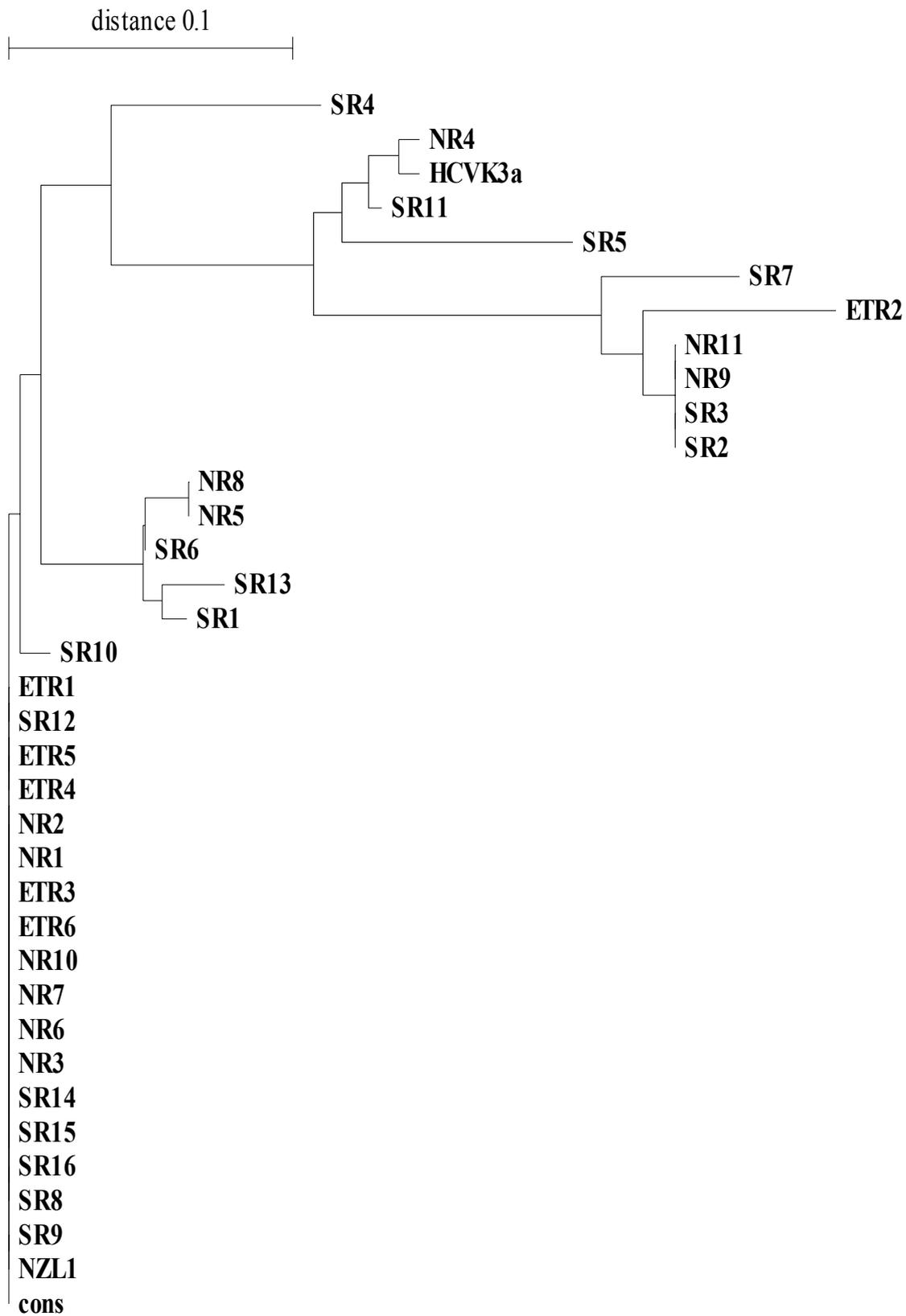


Abbildung 13: Baum zur Konformationsanalyse der E2-Sekundärstrukturen aller 33 Patienten, der Konsensussequenz und der Prototypsequenzen NZL1 sowie HCV-K3a

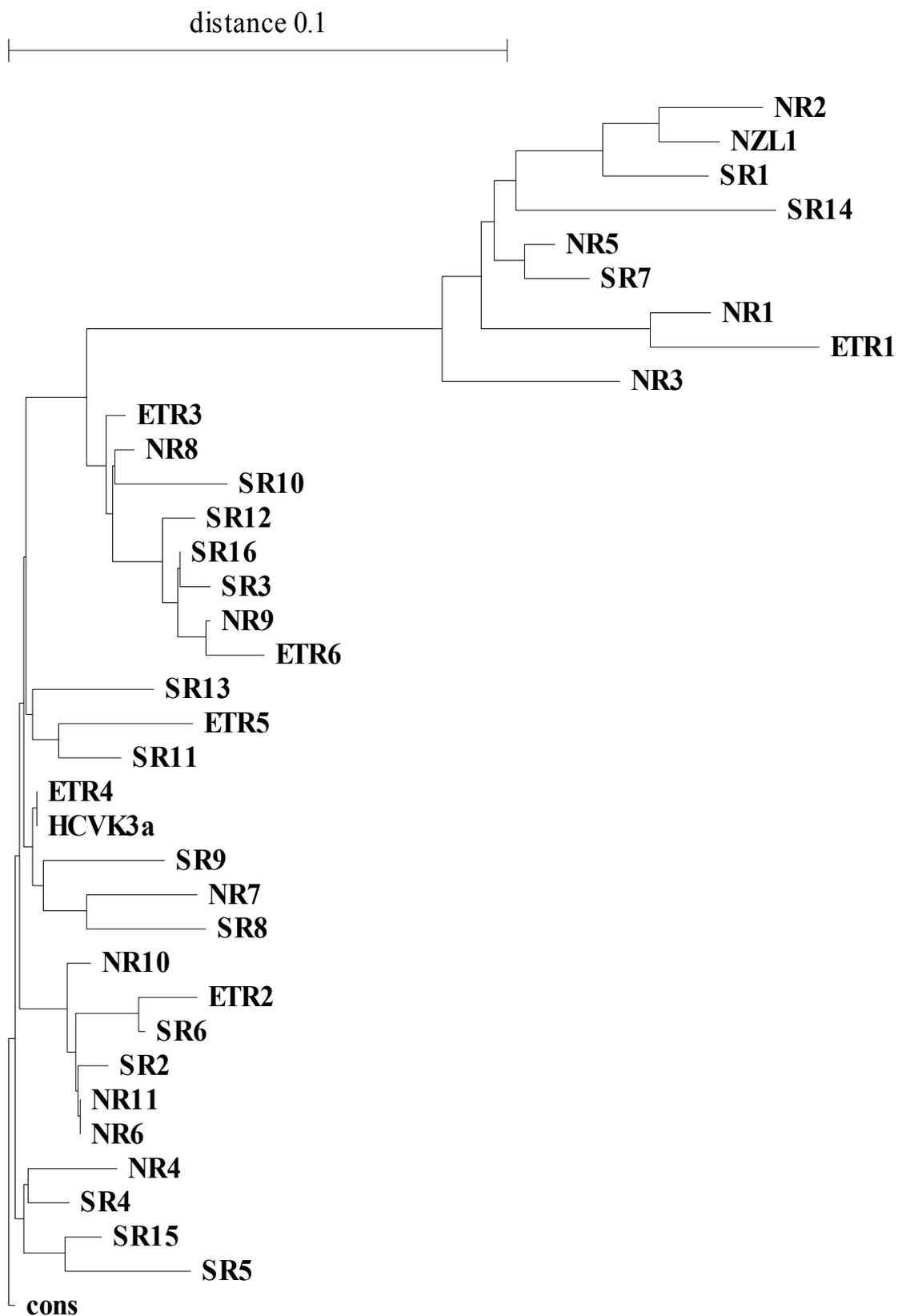


Abbildung 14: Baum zur Konformationsanalyse der NS5A-Sekundärstrukturen aller 33 Patienten, der Konsensussequenz und der Prototypsequenzen NZL1 sowie HCV-K3a

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 33 Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 3a infiziert waren, untersucht. Sie erhielten entweder eine Behandlung mit Interferon- α allein (n = 14) oder in Kombination mit Ribavirin (n = 19). Sechzehn Patienten erreichten dabei ein dauerhaftes virologisches Therapieansprechen, das als nicht nachweisbare HCV RNA 24 Wochen nach Therapieende definiert wurde (SR). Sechs Patienten waren am Ende der Therapie HCV RNA-negativ, erlitten aber einen Rückfall während der ersten 24 Wochen der Nachbeobachtung (ETR). Elf Patienten zeigten ein fehlendes virologisches Ansprechen auf die Therapie mit persistierend positiv nachweisbarer HCV RNA im Serum während der Therapie und der Nachbeobachtungszeit (NR). Bei allen 33 Patienten wurde der karboxyterminale Teil der E2- und NS5A-Region des HCV-Gens sequenziert und auf mögliche Mutationen (im Vergleich zu den HCV-Prototypen K3a und NZL1 sowie zur Konsensussequenz aus allen sequenzierten Isolaten), die mit dem virologischen Ansprechen auf die Therapie in Verbindung stehen könnten, untersucht.

5.1. Mutationen im Bereich des NS5A-Proteins

Der Hintergrund für den möglichen Einfluss des NS5A-Proteins auf den Ausgang einer Therapie mit IFN- α basiert auf Ergebnissen von in vitro-Untersuchungen von Gale et al. [30,31]. Dort wurde gezeigt, dass das NS5A-Protein von HCV-1-Isolaten die PKR in vitro an einer spezifischen PKR-Bindungsdomäne bindet, was zu einer Hemmung der PKR-Funktion führte. Physiologischerweise kommt es durch eine Interferon-vermittelte Hochregulation und Virus-RNA-aktivierte PKR zu einer Hemmung der Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors der Translation (eIF2 α) und damit zu einem Erliegen der Translation. Dies würde somit in Folge auch die Entstehung von viralen Proteinen beeinflussen.

Das Auftreten von multiplen Mutationen innerhalb der NS5A-PKR-Bindungsregion könnte mit einer verminderten Fähigkeit des NS5A-Proteins verbunden sein, die PKR zu hemmen und damit zu einer verbesserten Wirksamkeit des Interferon- α und letztlich zu einem besseren Therapieansprechen führen. Die ISDR ist Teil der

PKR-bindenden Domäne und für japanische Patienten, die mit dem HCV-1b-Typ infiziert waren, wurde ein Zusammenhang von einer zunehmenden Anzahl an Mutationen im Bereich der ISDR und einem zunehmenden Ansprechen auf eine Interferon-alfa-Therapie beschrieben. Für europäische Patienten konnte dieser Zusammenhang zunächst nicht in gleicher Weise festgestellt werden [23,43,106,123]. Neben einer Bedeutung von Mutationen im Bereich der ISDR könnten multiple bzw. spezifische Mutationen innerhalb der gesamten NS5A-PKR-Bindungsregion in vivo für die Sensitivität gegenüber einer Interferontherapie von Relevanz sein.

Studien, die den Zusammenhang zwischen Mutationen in der ISDR/PKR-Bindungsregion und dem Behandlungsergebnis untersuchten, wurden bisher ausschließlich an Patienten durchgeführt, die mit dem HCV-Genotyp 1b infiziert waren. Für Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 3a infiziert sind, wurden bis zum Abschluss unserer Untersuchungen nur kleine Studien mit Sequenzuntersuchungen ausschließlich der ISDR veröffentlicht. Squadrito et al. [106] untersuchte 18 Patienten, die mit dem Genotyp 3a infiziert waren. Dabei waren 11 Patienten Non-responder und 7 der Patienten waren Sustained-responder 24 Wochen nach Ende der Therapie. Die Aminosäuresequenzen innerhalb der ISDR der HCV-Isolate von diesen Patienten waren hoch konserviert. Nur bei einem Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen ist eine Mutation im Vergleich zum HCV-3a-Prototyp NZL1 beobachtet worden, alle anderen Patienten zeigten keine Mutationen. In der Studie von Sáiz et al. [93] wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt. Die Isolate von 5 HCV-3a-infizierten Patienten mit dauerhaftem Therapieansprechen und von 6 mit fehlendem Therapieansprechen zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR des NS5A-Gens. In einer dritten Studie von Frangeul et al. [28] wurde die ISDR von 7 Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 3a infiziert waren, sequenziert. Hier wurden keine Mutationen im Vergleich zum Prototyp NZL1 gefunden, weder bei den drei Non-respondern noch bei den 4 Sustained-respondern. In dieser Studie wurde aber oberhalb der ISDR, an Kodon 2161, eine einzelne Mutation (Alanin oder Valin anstelle von Threonin) beschrieben. Diese Mutation trat bei allen 4 Sustained-respondern auf, aber bei keinem der Non-responder. In allen drei Studien wurde die Sequenzierung allerdings auf die ISDR des NS5A-Gens beschränkt. In unserer

Studie wurde nun der karb-oxyterminale Teil des NS5A-Gens (Kodon 2144 bis 2300), einschließlich der Region um Kodon 2161, der Hyperphosphorylierungsregion mit Kodon 2203, 2207 und 2210, die ISDR sowie die komplette PKR-Bindungsregion sequenziert (Abb. 10). Weder die Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR noch die innerhalb der PKR-Bindungsregion korrelierte mit dem virologischen Therapieansprechen. Die aufgetretenen Mutationen waren immer auf alle drei Gruppen verteilt und zeigten keine statistische Signifikanz in Korrelation zum Ansprechen auf die Therapie. Auch konnte die Bedeutung der singulären Aminosäuremutation bei Kodon 2161 in Bezug auf die virologische Therapieantwort nicht bestätigt werden. Die Mehrzahl der untersuchten HCV-3a-Isolate wies unabhängig zum Therapieansprechen eine Mutation an Position 2161 in Form von Alanin oder Valin anstelle von Threonin auf (Abb. 10). Ein Einfluss von Mutationen innerhalb des gesamten karboxyterminalen Bereichs der NS5A-Region sowie im Bereich der ISDR/PKR-Bindungsregion als auch der Hypersphosphorylierungsregion auf das virologische Ansprechen einer Interferon-alfa-basierten Therapie kann damit auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit einer HCV-3a-Infektion ausgeschlossen werden. Das Vorhandensein von Mutationen im Zusammenhang mit dem virologischen Therapieansprechen bei Patienten mit einer HCV-Genotyp-3a-Infektion erscheint insgesamt vor dem Hintergrund der mit der gegenwärtigen Standardtherapie erreichten dauerhaften Heilungsrate von über 80 % bei dieser Patientengruppe unwahrscheinlich zu sein.

5.2. HCV RNA-Konzentration und E2-/NS5A-Mutationen

Im Vergleich wiesen in der vorliegenden Arbeit Patienten mit mehr als zwei Mutationen innerhalb der E2-Region bzw. mehr als vier Mutationen innerhalb der NS5A-Region eine im Mittel geringere HCV RNA-Konzentration vor Therapiebeginn auf als Patienten mit weniger als zwei bzw. vier Mutationen. Es wurden allerdings keine Zusammenhänge mit dem virologischen Therapieansprechen gefunden. In der Studie von Enomoto et al. [23] wurde ein statistisch signifikanter Bezug der HCV RNA-Konzentration vor Therapiebeginn mit Mutationen im Bereich der NS5A-ISDR bei HCV-1b-infizierten Patienten festgestellt. Squadrito et al. konnte nur einen Zusammenhang zwischen

dauerhaftem virologischen Therapieansprechen und einer geringen HCV RNA-Konzentration vor Therapiebeginn feststellen, nicht aber zwischen dem Vorhandensein von Mutationen innerhalb der NS5A-Region und einer geringen HCV RNA-Konzentration [106]. Kurosaki et al. [61] untersuchte Patienten mit den Genotypen 1b und 2 in Bezug auf Mutationen innerhalb der NS5A-Region, der Viruslast vor Therapie und einer Interferon- β -Therapie. Er konnte zeigen, dass Patienten mit Mutationen innerhalb der NS5A-Region eine geringere Viruslast vor Therapie aufwiesen und dass Patienten mit einer niedrigeren Viruslast auch besser auf eine Interferon- β -Therapie ansprachen. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch Murakami et al. [69] bei der Untersuchung von HCV-2a-infizierten Patienten, die mit Interferon- α behandelt wurden. Bei den HCV-2b-infizierten Patienten allerdings war wiederum nur eine Beziehung zwischen einem dauerhaften virologischen Ansprechen und einer geringen Viruslast zu erkennen, nicht aber zwischen der Anzahl der Mutationen in der ISDR und der HCV RNA-Konzentration vor Therapie. Komatsu et al. [57] untersuchte 16 Kinder und Jugendliche, die mit dem Genotyp 1b infiziert waren. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den HCV RNA-Konzentrationen vor Therapie bei Patienten mit oder ohne Mutationen innerhalb der NS5A-Region gefunden werden. Chayama et al. verglich 110 Patienten mit einer HCV-Genotyp-1b-Infektion [10]. Er beschrieb, dass eine geringe Viruslast vor Therapie und mehrere Mutationen innerhalb der ISDR mit einem besseren Therapieansprechen auf IFN- α einhergehen. Allerdings gab es in dieser Studie auch Patienten, die mit einer hohen Viruslast oder Sequenzen analog zum HCV-1b-Prototyp ein lang anhaltendes virologisches Therapieansprechen aufwiesen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien sind vermutlich sowohl auf die Untersuchung von verschiedenen Genotypen als auch auf den Einsatz verschiedener und letztlich nicht vergleichbarer Therapieregime zurückzuführen. Allerdings werden auch beim Vergleich von Studien mit identischen HCV-Geno-/-Subtypen differente Ergebnisse beschrieben. Dies ist wiederum durch unterschiedliche Therapieregime (Dosis und Dauer der Interferontherapie, zusätzliche Gabe von Ribavirin), aber möglicherweise auch durch die geografische Verteilung der Patienten mit zwar identischen HCV-Geno-/-Subtypen, jedoch unter-

schiedlichen Subgruppen zu erklären. Darüber hinaus ist eine Bedeutung von weiteren, bisher nicht bekannten Faktoren (wirtsspezifische Faktoren, z. B. des Immunsystems, sowie der Einfluss von weiteren HCV-Proteinen außerhalb von E2/NS5A), wahrscheinlich.

5.3. Mutationen im Bereich des E2-Proteins

Taylor et al. [108] zeigte, dass neben dem NS5A-Protein *in vitro* auch ein weiteres HCV-Protein in der Lage ist, mit der PKR zu interagieren. Die so genannte PePHD innerhalb des E2-Proteins von HCV-1a/b-Isolaten kann auf die PKR und den eIF2 α wirken, was in der Folge zu einer Hemmung der PKR-Funktion *in vitro* führt. Innerhalb der PePHD von HCV-2a/b- und 3a-Prototypisolaten wurden Mutationen gefunden, die nachfolgend eine Blockade der PKR-E2-Interaktion aufwiesen. Die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse war zum Zeitpunkt der Entstehung der vorliegenden Arbeit vollständig unbekannt. Zum einen könnten Mutationen im Bereich der PePHD bei Patienten mit einer HCV-Genotyp-1-Infektion zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Wirkung von Interferon- α mit entsprechend erhöhten virologischen Ansprechraten führen. Zum anderen wäre aber auch denkbar, dass bei Patienten mit einer HCV-Genotyp-3a-Infektion (deren Isolate primär eine Hemmung der PKR über eine Interaktion mit dem E2-Protein erschweren) und fehlendem dauerhaften Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie, Mutationen im Bereich der PePHD zu einer höheren Ähnlichkeit mit der HCV-1a/b-Sequenz der PePHD führen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der karboxyterminale Bereich des E2-Gens (Kodon 638 bis 704, entsprechend HCV-3a-Prototyp NZL1), der die PePHD enthält, sequenziert (Abb. 8). Im Vergleich zur Konsensussequenz und zum Prototyp NZL1 wurde innerhalb der PePHD (Kodon 665-676) bei einem von 16 Patienten mit SR zwei Mutationen bzw. bei 6 von 16 Patienten mit SR eine Mutation gefunden. Im Vergleich dazu wiesen 3 von 17 Patienten der beiden anderen Gruppen innerhalb der PePHD eine Mutation auf (2 NR, 1 ETR) (Abb. 8). Wegen der relativ hohen Anzahl von Patienten (n =9) innerhalb der SR-Gruppe, die keine Mutation im Bereich der PePHD aufwiesen, ergab sich aber zwischen den Gruppen keine statistische Signifikanz. Auch bei der Betrachtung der an die PePHD angrenzenden Regionen ergab sich kein Hinweis

für Sequenzveränderungen, die mit dem Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden könnten. In der Folge konnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt werden [1,6,35,82,91,98,116].

Interessanterweise wurden hydrophobe Mutationen innerhalb des hoch hydrophilen Bereichs des E2-Proteins ausschließlich bei Patienten mit SR (n=4) entdeckt (Q668L, H669A). Von Flint et al. liegen in vitro-Untersuchungen zu einem trunkierten E2-Protein vor. Dabei wurde festgestellt, dass E2 spezifisch an Zellen, die den zellulären Rezeptor CD81 exprimieren, bindet. CD81 ist auf vielen Zelloberflächen vorhanden, auch auf B-, T- und Leberzellen, und stellt einen notwendigen, jedoch nicht hinreichenden Rezeptor für den Eintritt des HCV in die Zielzellen dar. Wenn eine Verbindung von E2 mit CD81 zustande kam, was nicht mit allen Formen von CD81 möglich war, änderte sich die Konformation von E2. Beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern erkannten einige den entstandenen Komplex, andere nicht [26,27]. Wenn verschiedene Formen von CD81 unterschiedliche Bindungsaffinitäten von E2 hervorrufen, könnte dies umgekehrt ebenso der Fall sein. Wenn bestimmte Mutationen eine veränderte Form des E2-Proteins hervorrufen, wäre es diesem nicht möglich, sich an die CD81 expressionierenden Zellen zu binden bzw. würde die Bildung eines anders geformten Komplexes begünstigt. Dieser Effekt könnte durch o. g. Mutationen entstanden sein und einen besseren Therapieerfolg ermöglicht haben. Allerdings beruht die Hypothese dieses Zusammenhangs auf einer relativ kleinen untersuchten Patientenzahl und zudem wäre eine Bestätigung durch weitere funktionelle und konformationelle Analysen notwendig. Eine Studie zur Bedeutung von Mutationen im Bereich der vermuteten CD81-Bindungsstellen des E2-Proteins konnte keinen Zusammenhang mit dem virologischen Therapieansprechen nachweisen [44].

6. Zusammenfassung

Das Hepatitis C-Virus verfügt vermutlich ähnlich wie andere Viren über die Fähigkeit die Interferon-basierte Immunantwort des Wirtes zu antagonisieren. In diesem Zusammenhang wurde *in vitro* die Hemmung der Interferon-induzierten doppelstrang-RNA-aktivierten Proteinkinase (PKR) durch spezifische Interaktion mit einer die Interferon-Sensitivität determinierenden Region (ISDR) umfassenden PKR-bindenden Domäne des HCV-NS5A-Proteins und einer Phosphorylierungs-Homologiedomäne (PePHD) des HCV-E2-Proteins beschrieben.

Während die klinische Bedeutung von Mutationen im Bereich der ISDR/PKR-bindenden Domäne des HCV-NS5A-Proteins bei Patienten mit einer HCV-Genotyp-1-Infektion gut untersucht war, fehlten klinische Daten zu Patienten mit einer HCV-Genotyp-3a-Infektion, sowohl für das HCV-NS5A- als auch für das HCV-E2-Protein.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 33 Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 3a infiziert waren und eine Therapie mit Interferon-alfa mit und ohne Ribavirin über insgesamt 48 Wochen erhielten, untersucht. Es erfolgte eine Sequenzierung der HCV-Isolate der 33 Patienten aus Serumproben vor Beginn der antiviralen Therapie im karboxyterminalen Bereich des E2- und NS5A-Gens, der jeweils die vermuteten PKR-Interaktionsstellen umfasst. Die Analyse der Sequenzen zeigte weder eine Korrelation von einzelnen Mutationen noch der Anzahl der Mutationen im Bereich der PePHD des E2-Proteins, der gesamten sequenzierten Region des E2-Proteins, der ISDR bzw. der PKR-bindenden Domäne des NS5A-Proteins und der gesamten sequenzierten Region des NS5A-Proteins mit dem virologischen Ansprechen auf die Interferon-alfa-basierte Therapie. Auch in phylogenetischen und konformationellen Analysen der HCV-Sequenzen des E2- und NS5A-Proteins der 33 Patienten konnte kein Zusammenhang von Sequenzmustern bzw. Mustern der Sekundärstruktur mit dem virologischen Therapieansprechen nachgewiesen werden. Eine Korrelation einer vermehrten Anzahl von Mutationen in den genannten Bereichen des E2- bzw. NS5A-Proteins mit einer niedrigeren HCV RNA-Konzentration vor Therapiebeginn erreichte keine statistische Signifikanz. Aufgrund der hohen virologischen Ansprechraten von über 80 % unter der gegenwärtigen Standardtherapie mit PEG-Interferon-alfa und Ribavirin erscheint das Vor-

handensein von genomischen Mutationen der HCV-Proteine in Korrelation mit dem Therapieansprechen bei Patienten mit einer HCV-Genotyp-3a-Infektion insgesamt unwahrscheinlich zu sein. Darüber hinaus sind vermutlich neben den teilweise in der vorliegenden Arbeit untersuchten virologischen Parametern auch wirtsspezifische Mechanismen für die Sensitivität gegenüber der Interferon-basierten Therapie von Bedeutung.

7. Summary

The hepatitis C virus probably has similar to other viruses the capability to antagonize the interferon-based immune response of the host. In vitro the inhibition of interferon alfa-inducible double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) was described through specific interactions with the PKR-binding domain (including the interferon sensitivity determining region, ISDR) of the HCV NS5A protein and with a PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain (PePHD) of the HCV E2 protein.

Whereas the clinical impact of mutations localized in the ISDR/PKR-binding domain of the HCV NS5A protein in patients with a HCV genotype 1 infection is thoroughly investigated, data of patients with a HCV genotype 3a infection concerning mutations in the HCV NS5A and HCV E2 proteins were lacking.

Therefore we investigated in the present study 33 patients infected with HCV subtype 3a. All patients received an interferon-alfa therapy with or without ribavirin for 48 weeks. The carboxyterminal parts of HCV E2 and NS5A genes, which contain the presumed PKR-interaction areas, of the HCV isolates of the 33 patients were sequenced from pretreatment serum samples. The sequence analyses showed that neither specific mutations nor the number of mutations within the PePHD of the E2 protein, the entire sequenced E2 gene, the ISDR and the PKR-binding domain of the NS5A protein or the entire sequenced region of the NS5A gene correlated with the virologic response to interferon alfa-based therapy. Furthermore, phylogenetic and conformational analyses of the HCV sequences of E2 and NS5A proteins in the 33 patients could not prove an association of specific sequences or specific secondary structures with virologic response. A correlation of an increased number of mutations within the E2 and NS5A proteins with a lower HCV RNA concentration at baseline before initiation of antiviral therapy did not reach statistical significance. Due to a high virologic response rate of more than 80 % with the current standard therapy based on PEG-interferon-alfa and ribavirin a correlation between the presence of genomic mutations of the HCV proteins and response to antiviral therapy of patients with HCV genotype 3a infection overall seems unlikely. Furthermore, in addition to the virological parameters investigated in the present study most likely host specific mechanisms exist which influence the sensitivity/resistance to interferon-based therapy.

8. Literaturverzeichnis

1. Abid K, Quadri R, Negro F: Hepatitis C virus, the E2 envelope protein, and alpha-interferon resistance, *Science*, 2000, 287, 1555
2. Aiyama T, Yoshioka K, Takayanagi M, Iwata K, Okumura A, Kakumu S: Serum HCV RNA titer at the end of interferon therapy predicts the long-term outcome of treatment, *J Hepatol*, 1995, 23, 497-502
3. Alscher DM, Bode JC: Therapie der Hepatitis C, *Medizinische Klinik*, 1997, 92, 147-161
4. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobson H: Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions, *J Virol*, 1993, 67, 3835-3844
5. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R: Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus, *EMBO*, 1996, 15, 12-22
6. Berg T, Mas Marques A, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E: Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment, *Hepatology*, 2000, 32, 1386-1395
7. Blackburn P: Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay, *J Biol Chem*, 1979, 254, 12484-12587
8. Bukh J, Miller RH, Purcell RH: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes, *Semin Liver Dis*, 1995, 15, 41-63
9. Chang TW, Heel RC: Ribavirin and inosiplex: a review of their present status in viral diseases, *Drugs*, 1981, 22, 111-128
10. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H: Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection, *Hepatology*, 1997, 25, 745-749

11. 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 hepatitis genome, *Science*, 1989, 244, 359-362
12. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus, *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88, 2451-2455
13. Chou P, Fasman GD: Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Adv Enzymol*, 1978, 47, 45-148
14. Chung RT, Monto A, Dienstag JL, Kaplan LM: Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in american patients infected with genotype 1b hepatitis C virus, *J Med Virol*, 1999, 58, 353-358
15. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C, *N Engl J Med*, 1998, 339, 1493-1499
16. Deléage G, Roux B: An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction, *Protein Eng*, 1987, 1, 289-294
17. Dev AT, McCaw R, Sundararajan V, Bowden S, Sievert W: Southeast Asian patients with chronic hepatitis C: the impact of novel genotypes an race on treatment outcome, *Hepatology*, 2002, 36, 1259-1265
18. DiBisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ: Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis, *Hepatology*, 1991, 14, 969-974
19. DiBisceglie AM, Shindo M, Fong TL, Fried W, Swain MG, Bergasa V, Axiotis CA, Waggoner JG, Park Y, Hoofnagle JH: A pilot study of Ribavirin therapy for chronic hepatitis C, *Hepatology*, 1992, 16, 649
20. Drummer HE, Wilson KA, Pountourios P: Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81, *J Virol*, 2002, 76, 11143-11147

21. Duverlie G, Khorsi H, Castelain S, Jaillon O, Izopet J, Lunel F, Eb F, Penin F, Wychowski C: Sequence analysis of the NS5A protein of european hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity, *J of General Virol*, 79, 1373-1381
22. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C: Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region, *Clin Invest*, 1995, 96, 224-230
23. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1 b infection, *N Engl J Med*, 1996, 334, 77-81
24. Failla C, Tomei F, De FR: Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins, *J Virol*, 1994, 68, 3753-3760
25. Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 1985, 39, 783-791
26. Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA: Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD 81, *J Virol*, 1999, 73, 6235-6244
27. Flint M, Thomas JM, Maidens C, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA: Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein, *J Virol* 1999, 73, 6782-6790
28. Frangeul L, Cresta P, Perrin M, Lunel F, Opolon P, Agut H, Huraux JM: Mutations in NS5A region of hepatitis C virus genome correlate with presence of NS5A antibodies and response to interferon therapy for most common european hepatitis C virus genotypes, *Hepatology*, 1998, 28, 1674-1679
29. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J,

- Yu J: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection, *N Engl J Med*, 2002, 347, 975-982
30. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG : Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non-structural 5A protein, *Virology*, 1997, 14, 217-227
 31. Gale M Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG : Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation, *Mol Cell Biol*, 1998, 18, 5208-5218
 32. Gale M Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG: Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase, *J Virol*, 1999, 73, 6506-6516
 33. Gassen HG, Sachse GE, Schulte A: PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, NY, 1994
 34. Geourjon C, Deléage G: ANTHEPROT 2.0: a three-dimensional module fully coupled with protein sequence analysis methods, *J Mol Graphics*, 1995, 13, 209-212
 35. Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A, Alberti A: Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon, *Gastroenterology*, 2000, 119, 1649-1655
 36. Gitnick G: Hepatitis C: controversies, strategies and challenges. *Eur J Surg Suppl*, 1998, 582, 65-70
 37. Gordon SC, Elloway RS, Long JC, Dmuchowski CF: The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs. intravenous drug use, *Hepatology*, 1993, 18, 1338-1343
 38. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S,

- Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM: Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose, *Ann Intern Med*, 2004, 140, 346-355
39. Häussinger D, Niederau C: *Hepatitis C*, Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien, 1997
 40. Heintges T, Niederau C: Epidemiologie und Klinik der chronischen Virushepatitis, *Dt Med Wochenschrift*, 1994, 119, 1365-1370
 41. Herion D, Hoofnagle JH: The interferon sensitivity determining region: All hepatitis C virus isolates are not the same, *Hepatology*, 1997, 769-771
 42. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K: Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus, *J Virol*, 1993, 67, 4665-4675
 43. Hofgärtner WT, Polyak SJ, Sullivan DG, Carithers RL Jr., Gretch DR: Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in north american patients infected with HCV genotype 1a or 1b, *J Med Virol*, 1997, 53, 118-126
 44. Hofmann WP, Sarrazin C, Kronenberger B, Schonberger B, Bruch K, Zeuzem S: Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients, *J Infect Dis*, 2003, 187, 982-987
 45. Houts G, Miyagi M, Ellis C, Beard D, Beard JW: Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus, *J Virol*, 1979, 29, 517-522
 46. Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R: Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A, *Gene*, 1996, 182, 203-211
 47. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA, *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85, 9436-9440

48. Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M: Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo, *J Med Virol*, 2002, 66, 187-199
49. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from japanese patients with non-A, non-B hepatitis, *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87, 9524-9528
50. Kenny-Walsh E: Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin, *Eng J Med*, 1999, 340, 1228-1233
51. Khorsi H, Castelain S, Wyseur A, Izopet J, Canva V, Rombout A, Capron D, Capron JP, Lunel F, Stuyver L, Duverlie G: Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in french patients, *J Hepatol*, 1997, 27, 72-77
52. Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J: C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215, 160-166
53. Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J Mol Evol*, 1980, 16, 111-120
54. Kiyosawa K; Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Futua S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH: Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus, *Hepatology*, 1990, 12, 671-675
55. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J: Formulation and application of a numerical scoring system for asses-sing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis, *Hepatology*, 1981, 1, 431-435
56. Kobayashi M, Watanabe K, Ishigami M, Murase K, Ito H, Ukai K, Yano M, Takagi K, Hattori M, Kakumu S, Yoshioka K: Amino acid substitutions in the nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and its rela-

- tion to viral load and response to interferon, *Am J Gastroenterol*, 2002, 97, 988-998
57. Komatsu H, Fujisawa T, Inui A, Miyagawa Y, Onoue M: Mutations in the non-structural protein 5A gene and response to interferon therapy in young patients with chronic hepatitis C virus 1b infection, *J Med Virol*, 1997, 53, 361-365
 58. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G: Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade, *Ann Intern Med*, 1993, 119, 110-115
 59. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF: Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*, *Gene*, 1985, 35, 249-258
 60. Kronenberger B, Sarrazin C, Hofmann WP, von Wagner M, Herrmann E, Welsch C, Elez R, Rüster B, Piper A, Zeuzem S: Mutations in the putative HCV-E2 CD81 binding regions and correlation with cell surface CD81 expression, *J Viral Hepat*, 2004, 11, 310-318
 61. Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, Sakuma I, Asahina Y, Yamamoto C, Ikeda T, Tozuka S, Izumi N, Marumo F, Sato C: Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon- β therapy, *Hepatology*, 1997, 25, 750-753
 62. Lo S, Lin HH: Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment. *Virus Res*, 2001, 75, 107-112
 63. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial, *Lancet*, 2001, 358, 958-965
 64. Mattson L, Sonnerborg A, Weiland O: Outcome of acute asymptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers, *Liver*, 1993,13, 274-278

65. McHutchison, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C, *N Engl J Med*, 1998, 339, 1485-1492
66. McKechnie VM, Mills PR, McCrudden EA: The NS5A gene of hepatitis C virus in patients treated with interferon-alpha, *J Med Virol*, 2000, 60, 367-378
67. Microcon centrifugal filter devices-users manual, Amicon, Witten, 1997
68. Mizushima H, Hijikata M, Asabe SI, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K: Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different c termini, *J Virol*, 1994, 68, 6215-6222
69. Murakami T, Enomoto N, Kurosaki M, Izumi N, Marumo F, Sato C: Mutations in nonstructural protein 5A gene and response to interferon in hepatitis C virus genotype 2 infection, *Hepatology*, 1999, 30, 1045-1053
70. Nakashima H, Nishikawa K, Ooi T: The folding type of a protein is relevant to the amino acid composition, *J Biochem*, 1986, 99, 153-162
71. Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hurter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W, Häussinger D: Prognosis of hepatitis C: results of a large, prospective cohort study, *Hepatology*, 1998, 28, 1687-1695
72. Noguchi T, Satoh S, Noshi T, Hatada E, Fukuda R, Kawai A, Ikeda S, Hijikata M, Shimotohno K: Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells, *Microbiol Immunol*, 2001, 45, 829-840
73. Nousbaum J, Polyak SJ, Ray SC, Sullivan DG, Larson AM, Carithers RL Jr, Gretch DR: Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy, *J Virol*, 2000, 74, 9028-9038
74. Odeberg J, Yun Z, Sonnerborg A, Weiland O, Lundeberg J: Variation in the hepatitis C virus NS5A region in relation to hypervariable region 1 heterogeneity during interferon treatment, *J Med Virol*, 1998, 56, 33-38

75. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus, *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88, 3392-3396
76. Pagliaro L, Peri V, Linea C, Camma C, Giunta M, Magrin S: Natural history of chronic hepatitis C, *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 31, 28-44
77. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N: The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives, *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100, 6104-6108
78. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D: Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: Relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations, *J Virol*, 1998, 72, 2795-2805
79. Pawlotsky JM: Genetic heterogeneity and properties of hepatitis C virus, *Acta Gastroenterol Belg*, 1998, 61, 189-191
80. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D: Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A, *J Biol Chem*, 2004, 279, 40835-40843
81. Perriere G, Gouy M: WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequence banks, *Biochemie*, 1996, 78, 364-169
82. Polyak SJ, Nousbaum JB, Larson AM, Cotler S, Carithers RL, Gretch DR: The protein kinase-interacting domain in the hepatitis C virus envelope glycoprotein-2 gene is highly conserved in genotype 1-infected patients treated with interferon, *J Infect Dis*, 2000, 182, 397-404
83. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ido G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J: Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus, *The Lancet*, 1998, 352, 1426-1432

84. Produktbeschreibung Expand Reverse Transcriptase, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, 1999
85. Produktinformation Ampli TaqGold, Perkin Elmer, 1996, USA
86. Puig-Basagoiti D, Saiz JC, Forns X, Ampuradanes S, Gimenez-Barcons M, Franco S, Sanchez-Fueyo A, Costa J, Sanchez-Tapias JM, Rodes J: Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C, *J Med Virol*, 2001, 65, 35-44
87. Reiser M, Schmiegel WH: Fortschritt durch Kombinationstherapie mit Interferon alpha und Ribavirin, *Deutsches Ärzteblatt*, 1999, 96, 195-199
88. Richter G: *Praktische Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
89. Rodger AJ, Roberts S, Lanigan A, Bowden S, Brown T, Crofts N: Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975, *Hepatology*, 2000, 32, 582-587
90. Ruster B, Zeuzem S, Roth WK: Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript, *Anal Biochem*, 1995, 224, 597-600
91. Saito T, Ito T, Ishiko H, Yonaha M, Morikawa K, Miyokawa A, Mitamura K: Sequence analysis of PePHD within HCV E2 region and correlation with resistance of interferon therapy in Japanese patients infected with HCV genotypes 2a and 2b, *Am J Gastroenterol*, 2003, 98, 1377-1383
92. Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, 1987, 4, 406-425
93. Saiz JC, Lopez-Labrador FX, Ampuradanes S, Dopazo J, Forns X, Sanchez-Tapias JM, Rodes J: The prognostic relevance of the nonstructural 5 A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus, *J Infect Dis*, 1998, 177, 839-847
94. Sakamoto M, Akahane Y, Tsuda F, Tanaka T, Woodfield DG, Okamoto H: Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a, *J Gen Virol*, 1994, 75, 1761-1768

95. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich C, Roth WK, Zeuzem S: Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in european patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy, *J Hepatol*, 1999, 30, 1004-1013
96. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S: Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response, *J Infect Dis*, 2000, 181, 432-441
97. Sarrazin C, Trojan J, Zeuzem S: Wirkungsweise von Interferonen und Nucleosidanaloga, *Verdauungskrankheiten*, 2000, 3, 102-113
98. Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, Ruster B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S: Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy, *Virology*, 2001, 289, 150-163
99. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S: Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses, *J Virol*, 2002, 76, 11079-11090
100. Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, Buskell-Bales Z, Straley-Eason KD, Smoak BL, Johnson LD, Lee SR, Kaplan EL: 45-year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults, *Ann Intern Med*, 2000, 132, 105-111
101. Shafer RW, Levee DJ, Winters MA, Richmond KL, Huang D, Merigan TC : Comparison of QIAamp HCV kit spin columns, silica beads, and phenol-chloroform for recovering human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, *J Clin Microbiol*, 1997, 35, 520-522
102. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H: Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy, *Hepatology*, 1996, 23, 205-209
103. Simmonds P, Homes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS: Classification of hepatitis C virus into six ma-

- for genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region, *J Gen Virol*, 1993, 74, 2391-2399
104. Simmonds P: Variability of hepatitis C virus, *Hepatology*, 1995, 21, 570-583
 105. Simmonds P, Mellor J, Craxi A, Sanchez-Tapias JM, Alberti A, Prieto J, Colombo M, Rumi MG, Lo Iacano O, Ampurdances-Mingall S, Forns-Bernhardt X, Chemello L, Civeira MP, Frost C, Dusheiko G : Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western european patients, *J Hepatol*, 1996, 24, 517-524
 106. Squadrito G, Leone F, Sartori M, Nalpas B, Berthelot P, Raimondo G, Pol S, Bréchet C: Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa, *Gastroenterology*, 1997, 113, 567-572
 107. Tanji Y, Kaneko T, Satoh S, Shimotohno K: Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A, *J Virol*, 1995, 69, 3980-3986
 108. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein, *Science*, 1999, 285, 107-110
 109. Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB: Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain, *J Virol*, 2001, 75, 1265-1273
 110. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D: The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors, *JAMA*, 2000, 284, 450-456
 111. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 4673-4680

112. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL: Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C, *N Eng J Med*, 1995, 332, 1463-1466
113. Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G: Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis, *J Hepatology*, 1992, 16, 273-281
114. Van de Peer Y, de Wachter R: Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment, *Comput Applic Biosci*, 1994, 10, 569-570
115. Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J: Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening, *N Engl J Med*, 1999, 341, 866-870
116. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Itakura J, Tanabe Y, Sato C, Izumi N, Watanabe M: Amino acid substitutions in PKR-eIF2 phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus E2 protein in genotype 2a/2b and 1b in Japan and interferon efficacy, *Hepatol Res*, 2003, 26, 268-274
117. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U: Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study, *Hepatology*, 2000, 32, 91-96
118. Witherell GW, Beineke P: Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response, *J Med Virol*, 2001, 63, 8-16
119. Yamada N, Tanihara K, Mizokami M, Ohba K, Takada A, Tsutsumi M, Date T: Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes, *J Gen Virol*, 1994, 75, 3279-3284
120. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K: The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C, *Hepatology*, 1996, 23, 1334-1340
121. Yuki N, Hayashi N, Kasahara A, Hagiwara H, Takehara T, Oshita M, Katayama K, Fusamoto H, Kamada T: Pretreatment viral load and response to

- prolonged interferon-alpha course for chronic hepatitis C, *J Hepatol*, 1995, 22, 457-463
122. Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G: Virushepatitis C, *Z Gastroenterol*, 1995, 33, 117-132
 123. Zeuzem S, Lee JH, Roth WK: Mutations in the nonstructural 5A gene of european hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa, *Hepatology*, 1997, 25, 740-744
 124. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C, *N Engl J Med*, 2000, 343, 1666-1672
 125. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3, *J Hepatol*, 2004, 40, 993-999

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Mutationen innerhalb des strukturellen E2- und des nicht strukturellen NS5A-Proteins des Hepatitis C-Virus und Korrelation mit dem Ansprechen auf eine antivirale Therapie bei Patienten mit einer Hepatitis C-Genotyp-3a-Infektion

in der Klinik für Innere Medizin I / Gastroenterologie und Hepatologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn PD Dr. med. Christoph Sarrazin ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Aufsatz veröffentlicht:

Sarrazin C, Kornetzky I, Rüster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S: Mutations within E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response, *Hepatology*, 2000, 31, 1360-1370

Frankfurt am Main, 30. Juni 2005

Ilka Kornetzky

Lebenslauf

Name: Ilka Kornetzky
Anschrift: 07743 Jena, Neugasse 10
Geburtsdatum: 25.05.1970
Geburtsort: Radeberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1976 - 1980 Grundschule Bühlau
1980 - 1986 POS Großharthau
1991 - 1994 Hessenkolleg Frankfurt/Main

Studium: 1995 - 2001 Humanmedizin an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt/Main

Ärztliche Prüfung: 07.11.2001 Frankfurt/Main

Berufsausbildung: 1986 - 1988 Wirtschaftskaufmann LPG (T) Lauterbach

Berufstätigkeit: 1988 - 1989 Wirtschaftskaufmann LPG (T) Lauterbach
1989 - 1990 Sekretärin Ärztliches Begutachtungswesen
Bischofswerda
1990 - 1991 Sekretärin Praxis Dr. Krehan Darmstadt
1991 - 2001 Schreibkraft Praxis Dr. Neger Darmstadt,
Elisabethenstift Darmstadt, Kernspinpraxis Darmstadt
2002 - 2003 Ärztin im Praktikum Orthopädische Abteilung
des Helios-Klinikums Gotha/Ohrdruf
2003 - 2004 Ärztin Orthopädische Abteilung des Helios-
Klinikums Gotha/Ohrdruf
2004 Ärztin Innere Abteilung des Helios-Klinikums
Gotha/Ohrdruf
seit 01.01.2005 Ärztin Orthopädische Klinik des Rudolf-Elle-
Krankenhauses Eisenberg mit Lehrstuhl der Friedrich
Schiller-Universität Jena

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Zeuzem für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph Sarrazin für seine hervorragende Betreuung, seine Ausdauer und seine jederzeit freundliche Unterstützung.

Dankbar bin ich allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Klinik I der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M. mit ihrem Direktor Prof. Dr. W. F. Caspary für ihre Ratschläge, Geduld und das freundliche Arbeitsklima.

Ohne den seelischen Rückhalt durch meine Familie und meine Freunde wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen - vielen Dank an alle.

Nicht zuletzt bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Wolfgang Wimmer für die kontinuierlichen aufmunternden Worte, seine ständige Präsenz in allen Hoch- und vor allem Tiefphasen sowie für die vielen hilfreichen Tipps und Fragen.