

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. D. Häussinger

**Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP
auf das Therapieansprechen bei Patienten mit einer chronischen
Hepatitis C Virus Infektion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nebahat Sagir

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Ralf Kubitz

Korreferent: Prof. Dr. Ortwin Adams

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Epidemiologie
- 1.2 Übertragungswege
- 1.3 Klinik und Verlauf
- 1.4 Folgen der HCV-Infektion
- 1.5 Hepatitis C Virus
- 1.6 HCV Genotypen
- 1.7 Therapie der HCV Infektion
- 1.8 Die Gallensalzpumpe BSEP
- 1.9 Funktion der Gallensalzpumpe BSEP
- 1.10 Genetische Polymorphismen
- 1.11 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

2. Material und Methoden

- 2.1 Patienten
- 2.2 Kontrollkollektiv
- 2.3 Klinische und serologische Testverfahren
- 2.4 Therapieendpunkte
- 2.5 Bestimmung des V444A Polymorphismus
- 2.6 Statistische Verfahren

3. Ergebnisse

- 3.1 Patienten
- 3.2 Therapieansprechen aller Patienten
- 3.3 Prävalenz des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP
- 3.4 Therapieansprechen in Abhängigkeit des V444A Polymorphismus (Wildtyp vs. Heterozygotie/Homozygotie)
- 3.5 Multivariate Analyse
- 3.6 Einfluss des Polymorphismus V444A auf das Therapieansprechen in Abhängigkeit des HCV Genotyps
- 3.7 Subgruppenanalyse
 - 3.7.1 V444A Wildtyp vs. V444A Heterozygotie

- 3.7.2 V444A Wildtyp vs. V444A Homozygotie
- 3.7.3 V444A Heterozygotie vs. V444A Homozygotie

4. Diskussion

- 4.1. Therapieansprechen insgesamt
- 4.2. Untersuchung des Patientenkollektivs auf Repräsentativität
- 4.3. Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP auf das Therapieansprechen

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Lebenslauf

9. Danksagung

1.1 Epidemiologie

Weltweit sind 100-170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert [1]. In Deutschland geht man von etwa 500 000 bis 1 Million HCV-Infizierten aus, das entspricht einer Prävalenz von ca. 0,5%-1%. Pro Jahr wird mit etwa 5000 Neuinfektionen gerechnet. Die Prävalenz variiert regional sehr stark. Während die Prävalenz von HCV-Antikörpern bei Blutspendern in Zentraleuropa relativ niedrig ist, finden sich in anderen Gegenden der Welt erheblich höhere Durchseuchungsraten: In Ostasien und Indien liegt die Prävalenz bei 1,5-1,9%, in Nordafrika und Saudi-Arabien werden Größenordnungen bis zu 2,1% angegeben [2-4]. Die Antikörperprävalenz von 24% in Ägypten erklärt sich dadurch, dass bei der parenteralen Therapie der Schistosomiasis die HCV-Infektion durch infizierte Spritzen und Kanülen in großem Umfang übertragen wurde [5].

1.2 Übertragungswege

Die HCV-Infektion wird überwiegend parenteral übertragen. Hierunter fallen Infektionen durch kontaminierte Blutkonserven und Plasmaprodukte wie z. B. Gerinnungsfaktoren ebenso wie die Mehrfachverwendung von Injektionskanülen [6]. Bei der HCV-Übertragung durch Blut und Blutprodukte handelt es sich um die typische „Posttransfusionshepatitis“, die in retrospektiven Studien über 90% der Non-A-non-B-Hepatitisen zugeordnet werden konnte [7]. Mit der Einführung der gesetzlich vorgeschriebenen Testung sämtlicher Blutkonserven in Deutschland mit einem Anti-HCV- und HCV-RNA Test konnte praktisch eine Elimination der Posttransfusionshepatitis C erreicht werden [8, 9].

Eine Häufung der Infektion beobachtet man ferner bei Hämodialysepatienten, tätowierten Personen und Nadelstichverletzungen [10-16]. Diese ist durch eine ineffektive Sterilisierung von medizinischen Geräten, die wiederholte Benutzung von Einmalartikeln, das Verwenden von Glasspritzen etc. bedingt [17]. Dieser Übertragungsweg stellt heute, vor allem in Ländern der Dritten Welt, einen zentralen Faktor für die unverändert hohe Verbreitung des HCV dar.

Zu den nicht parenteralen Übertragungswegen zählt die Übertragung durch Geschlechtsverkehr, die intrafamiliäre und die perinatale Übertragung. Eine heterosexuelle Transmission der HCV-Infektion in monogamen Beziehungen ist selten [18, 19]. Die Prävalenz von Anti-HCV bei Sexualpartnern von Personen mit

chronischer Hepatitis C liegt zwischen 0 und 7%, wenn die Geschlechtspartner kein zusätzliches Risiko (z. B. i. v. Drogenabusus) aufweisen [20].

Die Übertragung des HCV innerhalb der Familie auf Personen, die keine Sexualpartner des infizierten Patienten sind, ist extrem niedrig [21-23]. In Deutschland unterscheidet sich das Risiko nicht von denjenigen der Normalpopulation [24, 25].

1.3 Klinik und Verlauf

Das Krankheitsbild der akuten Hepatitis C unterscheidet sich nicht von einer Virushepatitis anderer Ätiologie: Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen oder Druckgefühl im rechten Oberbauch, dunkler Urin und Ikterus nach einer mittleren Inkubationszeit von etwa 6-12 Wochen charakterisieren die akute Erkrankung. Allerdings zeigen nur ca. 20% der Patienten diese Symptome [26-28].

Klinisch verläuft die akute Hepatitis C meistens mild. Transaminasen über 600 U/l werden nur gelegentlich beobachtet. Fulminante Verläufe einer Hepatitis C sind beschrieben, jedoch außerordentlich selten. Die Symptome dauern etwa 6-12 Wochen. Der Hauptteil (über 90%) der akuten ikterisch verlaufenden HCV-Infektionen heilt aus. Da die akute Hepatitis häufig asymptomatisch verläuft, ist die Diagnosestellung entsprechend erschwert. Das Chronifizierungsrisiko der nicht-ikterisch verlaufenden HCV-Infektion liegt bei ca. 80% und höher, so dass der Ikterus bei der akuten HCV-Infektion als prognostisch günstig einzustufen ist.

Ist das HCV länger als 6 Monate nachweisbar, liegt eine chronische Hepatitis C vor. Der typische Patient mit chronischer Hepatitis C hat wenige Symptome. Falls überhaupt Symptome auftreten, so sind sie unspezifisch, oft nur intermittierend vorhanden und in der Regel mild. Die allgemeine Müdigkeit ist ein Leitsymptom. Gelegentlich werden Beschwerden im rechten Oberbauch, Übelkeit, Erbrechen und Juckreiz angegeben.

Die wesentlichen klinischen Befunde sind Hepato- und Splenomegalie. Ein Ikterus kann in seltenen Fällen beobachtet werden. Die Transaminasen können stark schwanken. In der Regel liegen die Transaminasen zwischen dem 1,5 bis 10-fachen der oberen Norm oder können zwischenzeitlich normal sein, wobei diese Intervalle

unterschiedlich lang sein können. In ca. einem Drittel der Fälle beobachtet man die beschriebenen Symptome [29-31].

Der natürliche Verlauf der Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich gibt es in den ersten 20 Jahren nach Infektion keine oder allenfalls eine geringe Steigerung der Mortalität, die aber in der Patientengruppe mit einer Leberzirrhose langsam ansteigt. Begünstigend für die Entwicklung einer Zirrhose sind eine lange Erkrankungsdauer, ein Lebensalter > 40 Jahre zum Zeitpunkt der Infektion und das männliche Geschlecht (wahrscheinlich durch den stärkeren Alkoholkonsum). Zusätzliche Stoffwechselerkrankungen wie die Hämochromatose, M. Wilson und α 1-Antitrypsinmangel sind ebenfalls unabhängige Risikofaktoren. Auch hoher Alkoholkonsum und Begleitinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder dem Hepatitis B Virus erhöhen die Mortalitätsrate [32-34].

1.4 Folgen der HCV-Infektion

Der natürliche Verlauf der chronischen Hepatitis C ist individuell sehr unterschiedlich. Die chronische Hepatitis C kann alle histologischen Stadien bis hin zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom (HCC) durchlaufen. Aufgrund der stark schwankenden, häufig über Monate normalen Transaminasen ist der natürliche Verlauf der chronischen Hepatitis C sehr unterschiedlich. Bisherige Erkenntnisse über den natürlichen Verlauf der Erkrankung sind stark beeinflusst durch die Art der Untersuchung, also davon, ob es sich um retrospektive oder prospektive Studien handelt. Die Tabelle 1.1 stellt die unterschiedlichen Studienarten und deren Ergebnisse dar [28].

Sudienart	Patienten (n)	Zeitraum nach Exposition (Jahre)	Zirrhose (%)	HCC (%)	Tod aus hepatischer Ursache (%)
Retrospektiv					
Gaster et al [31]	131	14 – 28	51	11	15
Poynard et al [32]	70	-	50	-	-
Fong et al [33]	838	9 – 22	17	2	4
Tefler et al [34]	215	19	55	4	-
Prospektiv					
Tong et al [35]	65	10	12	0	4
Yano et al [36]	80	16	7	1	1
Niederau et al [37]	61	13	8	-	2
Gordon et al [38]	135	8	16	1	4
Kohortenstudie					
Di Bisceglie et al [39]	376	17	2	0	0

Tab. 1.1 Studien zum Langzeitverlauf der chronischen HCV Infektion

Allerdings ist es unverändert schwierig, den individuellen Patienten von vornherein in die verschiedenen Kategorien möglicher Spontanverläufe einzuordnen, die summarisch in Abb. 1.1 zusammengefasst sind [40].

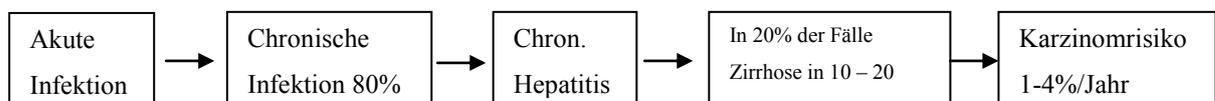


Abb. 1.1 Spontanverlauf der HCV Infektion

Dies stellt den Arzt vor die oftmals schwierige Aufgabe der Wertung von Einzelparametern zur Festlegung der Individualprognose.

Man weiß, dass das Alter des Patienten bei der Erstinfektion eine Rolle hinsichtlich der Zirrhoseentwicklung spielt (Tab 1.2): Ist der Patient bei der Erstinfektion 20-30 Jahre alt, so konnte man nach einer Laufzeit von über 15 Jahren in der Leberbiopsie in 18 % der Fälle eine Zirrhose feststellen. Ist dagegen der Patient bei der

Erstinfektion älter als 50 Jahre, konnte bei mehr als 15-jähriger Dauer der Infektion in einer Leberbiopsieprobe in 70% der Fälle eine Zirrhose festgestellt werden [41].

	Risiko	
	niedrig	hoch
Infektionszeit (Alter)	< 40 Jahre	> 40 Jahre
Alkohol/Tag	< 50g	≥ 50g
Geschlecht	weiblich	männlich

Tab. 1.2 Natürlicher Verlauf der HCV Infektion

Einfluss von 1. Infektionszeitpunkt, 2. Geschlecht und 3. Alkoholkonsum und auf das Risiko der Zirrhoseentwicklung [28]

Weitere Risikofaktoren sind für den natürlichen Verlauf, die teilweise von den Patienten beeinflussbar sind, von großer Bedeutung. Hierzu zählen vor allem Alkohol- und Nikotingenuss oder auch Übergewicht- in allen Fällen wird ein negativer Einfluss auf die Krankheitsprogression beobachtet.

Dass Frauen, die sich in der Prämenopause infizieren, offensichtlich günstigere Krankheitsverläufe aufweisen als Frauen mit einer Infektion während der Postmenopause, wird durch den kontinuierlichen Eisenentzug durch die Menstruation erklärt. Aus Tierexperimenten weiß man, dass eine vermehrte Eisenzufuhr keinen Einfluss auf die Viruslast hat, jedoch zu einer deutlichen Verschlechterung der Lebererkrankung führt, ablesbar an einem Anstieg der Transaminasen und entsprechenden histologischen Veränderungen [42]. Diese Gegebenheiten haben unter anderem zum Versuch der Ausheilung der Infektion durch repetitive Phlebotomien geführt [43-47].

Koinfektionen, wie z. B. mit HBV und HDV, verschlechtern die Histologie und den klinischen Verlauf im Vergleich zu einer Mono-Infektion. Gleichzeitig Marker einer B-Virusinfektion weisen etwa 2 bis 10% der Anti-HCV-positiven Personen auf [48].

Die initiale Leberhistologie hat einen hohen Stellenwert für die Prognose des Langzeitverlaufes: Im Falle einer milden chronischen Hepatitis C (früher: chronisch-persistierende Hepatitis [CPH] bleibt nach einer durchschnittlichen Laufzeit von 11 ± 9 Jahren die Histologie bei 50% der Patienten unverändert, bei mäßig aktiver

chronischer Hepatitis in der Erstbiopsie entwickeln in einem Zeitraum von durchschnittlich 9 ± 6 Jahren 44% eine schwere chronische Hepatitis und 19 % eine Zirrhose. Lag bereits bei der initialen Histologie eine schwere aktive Hepatitis C vor, so entwickeln nach einem Zeitraum von nur 7 ± 4 Jahren 71% der Patienten das Vollbild einer Leberzirrhose [49]. Somit eignet sich das Ergebnis der initialen Leberhistologie ausgezeichnet für die Prognoseeinschätzung des Langzeitverlaufes.

1.5 Hepatitis C Virus

Aus Plasma eines artifiziell infizierten Schimpansen, der chronisch an einer „Non-A-non-B-Hepatitis“ erkrankte, gelang Ende der 80er Jahre die Isolierung des Genoms des Hepatitis-C-Virus [50-52]. Die molekularbiologische Charakterisierung des HCV zeigte, dass das Virus als eigene Gattung der Hepaciviren in die Familie der Flaviviridae einzuordnen ist. Die nächsten Verwandten humaner Viren sind die Erreger der Hepatitis G, des Gelbfiebers und des Dengue-Fiebers. Bei dem Genom des HCV handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA-Virus mit einer Länge von etwa 9600 Nukleotiden (Abb. 1.2) [53].

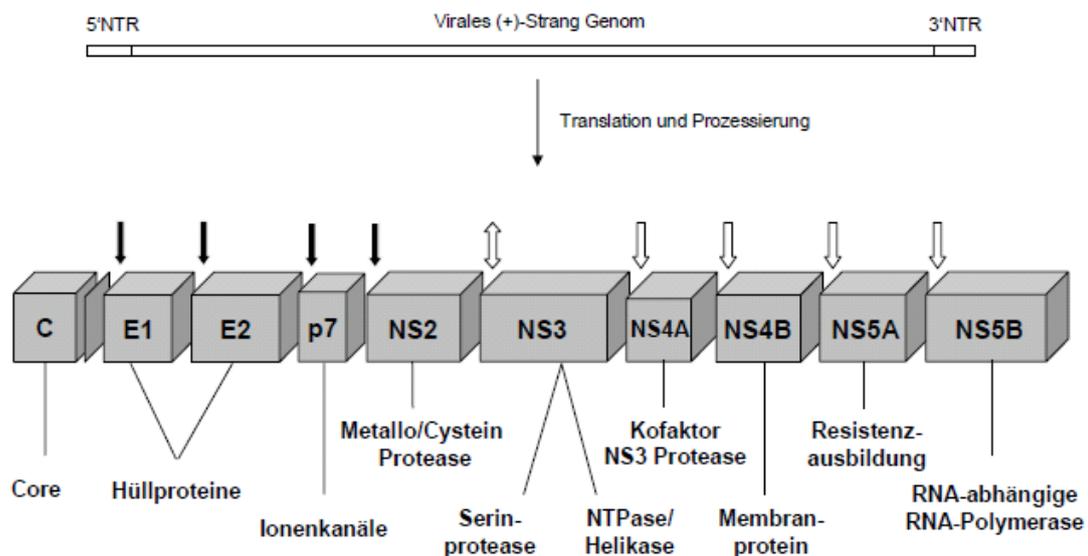


Abb. 1.2 Organisation des HCV-Genoms

NTR=nicht-translativ Region; C=Core; E=envelope; NS=Nicht-Struktur-Proteine; die Pfeile markieren die Schnittstellen für die einzelnen Proteine (nach: Häussinger et al. Hepatitis C; Blackwell 2001)

Die Struktur des HCV ist in der Zwischenzeit gut bekannt: Sie besteht aus einer Hülle mit unterschiedlichen Hüllproteinen (E1 und E2), einem Kernprotein (Core) und der Erbsubstanz (RNA-Genom). Im Gen unterscheidet man verschiedene Abschnitte: solche, die für Hüll- und Strukturproteine (C, E1, E2) kodieren, sowie nichtstrukturelle Gene (NS2, NS3, NS5), die für regulatorische Proteine kodieren [54].

Das Genom besteht aus einer 5'-nicht-kodierenden Region, einem offenen Leserahmen (kodierend für ein Vorläuferprotein von ca. 3000 Aminosäuren) und einer 3'-nicht-kodierenden Region.

Nach proteolytischer Spaltung des Vorläuferproteins durch zelluläre und viruskodierte Proteasen entstehen drei strukturbildende Proteine (Core, E1 und E2) sowie die sechs Nichtstrukturproteine NS2-NS5B.

Die Replikation des Virus erfolgt über die Transkription genomischer plus-Strang-RNA in minus-Strang-RNA. Da die Transkriptionsgenauigkeit der HCV Polymerase niedrig ist, resultiert eine hohe Genomvariabilität.

1.6 HCV Genotypen

Die HCV-Genotypen werden über die Aminosäure-Sequenz des HCV unterschieden. Es liegen dann unterschiedliche HCV-Genotypen vor, wenn die Homologie der Aminosäure-Sequenzen, bezogen auf das Gesamtgenom, weniger als 72% beträgt. Liegt die Sequenzhomologie zwischen 75 und 86% werden Isolate in unterschiedliche Subtypen des gleichen Genotyps eingeordnet [55, 56]. Hieraus resultieren 6 Hauptgenotypen des HCV.

Die HCV Genotypen 1, 2 und 3 werden weltweit am häufigsten beobachtet. Betrachtet man die Subtypenverteilung, so zeigt sich, dass der Genotyp 1a in Nordeuropa, Westeuropa und Nordamerika bei weitem dominiert, während der Genotyp 1b der hauptsächliche Genotyp in Japan ist [57-62].

Der HCV-Genotyp 3 kommt überwiegend in Südostasien vor. Bei jüngeren Patienten, die als Risikofaktor einen i. v. Drogengebrauch aufweisen, ist der HCV-Genotyp 3 der am häufigsten beobachtete Typ in unserer Region.

Der HCV-Genotyp 4 ist im Wesentlichen im Mittleren Osten, Ägypten und Zentralafrika zu finden, während der Genotyp 5 vor allem in Südafrika auftritt. Der Genotyp 6 kommt hauptsächlich in Hongkong und Vietnam vor [61].

Die Prävalenz des Genotyps 1 (1a-1b) liegt in Deutschland bei mehr als 80%, gefolgt von den Genotypen 2 und 3a [55].

Der HCV-Genotyp ist für den Therapieerfolg ein wichtiger prädiktiver Faktor. Als therapeutisch günstige Genotypen haben sich die HCV-Genotypen 2 und 3 herausgestellt [62].

1.7 Therapie der HCV Infektion

Das Hauptziel der Therapie ist die Viruselimination und damit das Ausheilen der Infektion. Gelingt dies nicht, stellt die Senkung der HCV-bedingten Mortalität das sekundäre Ziel dar. Weitere Ziele der Therapie sind die Verhinderung oder Behandlung der mit der Hepatitis C assoziierten Erkrankungen (z. B. membranoproliferative Glomerulonephritis, Kryoglobulinämie, Thyreoiditis, Porphyria cutanea tarda). Des Weiteren steht die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten im Vordergrund.

Zu Beginn stellte die Therapie mit Interferon- α die einzige Möglichkeit der Behandlung der Hepatitis C dar. Interferone sind Proteine, die den Zytokinen zugeordnet sind und von Leukozyten und Fibroblasten als Reaktion auf eine Virusinfektion gebildet werden. Sie besitzen antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften [63, 64].

Die Interferone können in drei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 1.3):

Interferonart	Bildungsort
Interferon- α (IFN- α)	Monozyten und B Lymphozyten
Interferon- β (IFN- β)	Fibroblasten
Interferon- γ (IFN- γ)	T-Lymphozyten

Tab. 1.3 Interferone und deren Bildungsorte

Die Interferon-Monotherapie stellt eine effektive Therapie der **akuten** HCV-Infektion dar. Die Therapiedauer beträgt 24 Wochen. Der 4-wöchigen täglichen

Injektion von 5 Mio. internationale Einheiten (IE) Interferon- α s.c. folgt die 20-wöchige Therapie mit 3x3 Mio. IE IFN. Diese Therapie führt in 98% zu einer Ausheilung der akuten HCV-Infektion [65]. Die unbehandelte akute anikterisch verlaufende HCV-Infektion chronifiziert in ca. 80% [66, 67].

Auch am Anfang der Therapie der chronischen HCV-Infektion stand die IFN-Monotherapie. In einer Dosierung von 3x3 Mio. Einheiten pro Woche über 48 Wochen heilten ca. 15% der HCV Infektionen aus [68]. Später wurde diese durch eine Kombinationstherapie bestehend aus IFN und Ribavirin ersetzt [69, 70]. Eine Weiterentwicklung der Standard-IFNe stellen die pegylierten IFNe (PEG-IFN) dar. Hier ist das IFN kovalent an Polyethylenglykol gebunden, welches zur Depotwirkung mit längerer Halbwertszeit dieser IFNe führt. Daher braucht das PEG-IFN nur noch einmal pro Woche appliziert zu werden, um die Virusreplikation über eine Woche effektiv zu unterdrücken [71, 72].

Lagen die Ansprechraten mit der IFN-Monotherapie bei ca. 15%, können mit der Kombinationstherapie aus Standard IFN und Ribavirin Ansprechquoten um 40% erzielt werden. Nach Einführung des pegylierten IFN-alpha konnten die Therapieansprechraten noch einmal erhöht werden, so dass diese bei therapienaiven Patienten abhängig vom HCV Genotyp zwischen 50% und 80% liegen [68-76].

Ein anhaltender Therapieerfolg („sustained response“) liegt vor, wenn 6 Monate nach Behandlungsende die Transaminasen weiterhin im Normbereich liegen und HCV-RNA nicht nachweisbar ist. Konnte die HCV-RNA unter der Therapie nicht mehr nachgewiesen werden und ist diese nach Beendigung der Therapie wieder nachweisbar, so liegt ein Rückfall (relapse) vor. Im ungünstigsten Fall kommt es zu keinem Zeitpunkt der Therapie zur Viruselimination (non-response).

Als Prädiktoren eines Therapieansprechens konnten in großen Studien folgende Faktoren identifiziert werden [72]:

1. Weibliches Geschlecht
2. Alter kleiner als 40 Jahre
3. HCV Genotypen 2 oder 3
4. Infektionsdauer weniger als 5 Jahre
5. Viruslast < 2.000.000 Kopien/ml vor Therapiebeginn

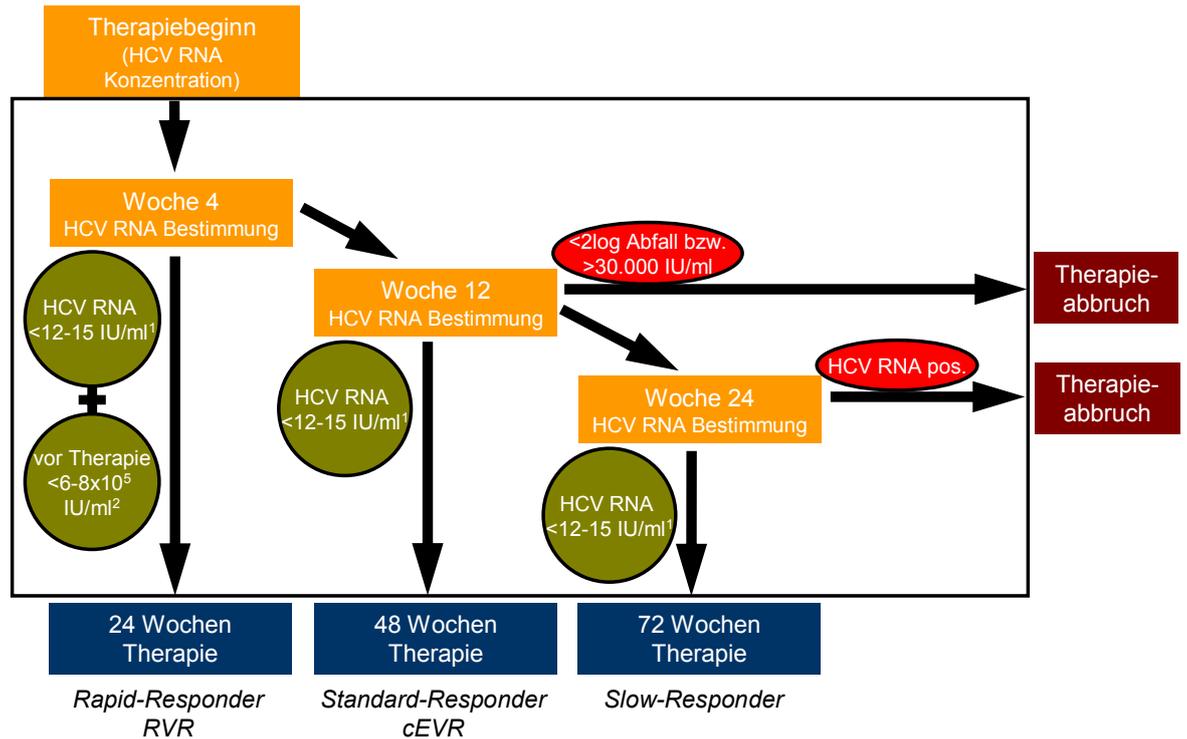
Neben diesen positiv-prädiktiven Faktoren für das Therapieansprechen konnten Faktoren, wie ein erhöhtes Bilirubin und eine Thrombozytopenie, als negative Prädiktoren für eine erfolgreiche Therapie identifiziert werden [77].

Die Therapieempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen sind derzeit wie folgt [78]:

1. Therapienaive Patienten

Patienten mit Genotyp 1

Vor Beginn der Therapie sollte eine Hepatitis C Viruslast bestimmt werden. Nach 4 Wochen Therapie erfolgt die erste Kontrolle unter der Therapie. Ist zu diesem Zeitpunkt keine HCV-RNA mehr nachweisbar und war die initiale HCV-RNA kleiner als 800 000 IU/ml, so reicht eine 24-wöchige Therapie aus [74]. Trifft dies nicht zu, sollte die nächste Kontrolle nach 12 Wochen Therapie erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass die Viruslast nach 12 Wochen Therapie für die Fortführung der Therapie entscheidend ist. Ist das Virus zu dieser Zeit weiterhin nachweisbar oder zumindest die Viruslast nicht mindestens um zwei log-Stufen abgefallen, so ist nicht mehr mit einem Therapieansprechen zu rechnen, so dass die Therapie abgebrochen werden sollte. Bei Negativität zur Woche 12 sollte die Therapie für insgesamt 48 Wochen durchgeführt werden. Ist es zu einem Abfall der HCV-RNA um mindestens 2 log-Stufen gekommen ohne jedoch unterhalb der Nachweisgrenze zu liegen, so ist die Therapie bis zur 24. Therapiewoche fortzusetzen. Zu diesem Zeitpunkt muss es zur Eliminierung des HCV gekommen sein. Ist dies nicht der Fall, kann die Therapie abgebrochen werden. Andernfalls ist eine Therapieverlängerung auf insgesamt 72 Wochen sinnvoll [76] (Abb. 1.4).



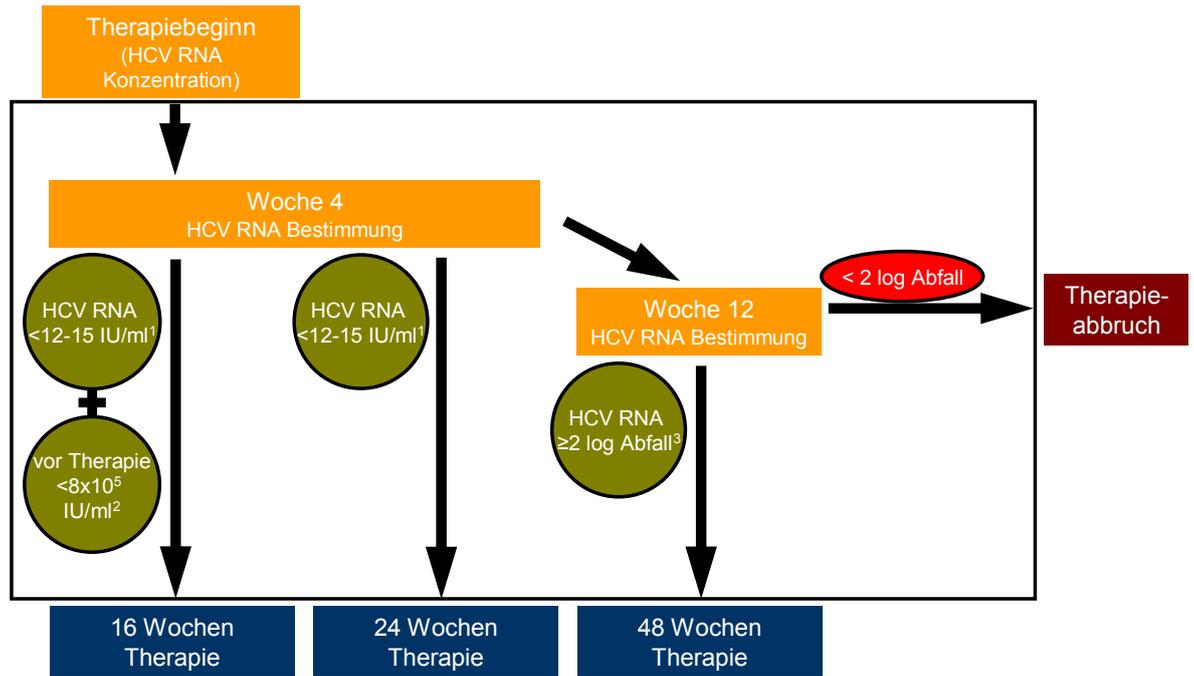
¹ HCV RNA mit einem hochsensitiven Assay nicht nachweisbar, <math><12-15 \text{ IU/ml}</math> oder <math><50 \text{ IU/ml}</math> je nach verwendetem Assay.
² Grenzwert für Ausgangsviruslast vor Therapie in den zugrundeliegenden Studien für PEG-Interferon alfa 2b bei 600.000 und für PEG-Interferon alfa 2a bei 800.000 IU/ml. Ggf. keine Therapieverkürzung bei negativen Prädiktoren wie fortgeschrittene Fibrose / Zirrhose, metabol. Syndrom, Insulinresistenz, Steatosis hepatis. Keine Daten bei Patienten mit normalen Transaminasen.

Abb. 1.4 Therapiealgorithmus der chronischen Hepatitis C (Genotyp 1)

(nach: Update der S3 Leitlinie, AWMF-Register-Nr.: 021/012)

Patienten mit Genotyp 2 oder 3

Wie bei den Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert sind, ist auch hier die Viruskinetik für die Therapiedauer entscheidend. Vor Beginn der Therapie sollte eine Hepatitis C Viruslast bestimmt werden. Nach 4 Wochen Therapie erfolgt die erste Kontrolle unter der Therapie. Ist zu diesem Zeitpunkt keine HCV-RNA mehr nachweisbar und war die initiale HCV-RNA <math>< 800.000 \text{ IU/ml}</math>, so reicht eine 16-wöchige Therapie aus. War die HCV-RNA zu Beginn der Therapie $> 800.000 \text{ IU/ml}$ ist eine 24-wöchige Therapie indiziert. Sollte nach 4 Wochen Therapie HCV RNA noch nachweisbar sein, erfolgt die nächste Kontrolluntersuchung nach 12 Wochen Therapie. Hier ist wieder die HCV-RNA für die weitere Therapie entscheidend. Ist es nicht zu einem Abfall der HCV-RNA um mindestens 2-Log Stufen gekommen, ist von einem fehlenden Ansprechen auszugehen und die Therapie sollte abgebrochen werden. Im anderen Fall ist die Therapie für insgesamt 48 Wochen durchzuführen (Abb. 1.5).



¹ HCV RNA mit einem hochempfindlichen Assay nicht nachweisbar, <math><12-15</math> IU/ml oder <math><50</math> IU/ml je nach verwendetem Assay.
² Die Therapieverkürzung ist bisher nicht zugelassen. Keine Therapieverkürzung bei negativen Prädiktoren wie fortgeschrittene Fibrose / Zirrhose. Ggf. Berücksichtigung weiterer negativer Prädiktoren wie Steatosis hepatis und niedrige ALT-Konzentration vor Therapiebeginn. Keine Daten bei Patienten mit normalen Transaminasen.
³ Bei fehlendem Abfall der HCV RNA unter die Nachweisgrenze (<math><12-15</math> IU/ml) bis Woche 24 Therapieabbruch empfohlen.

Abb. 1. 5 Therapiealgorithmus der chronischen Hepatitis C (Genotyp 2 und 3).

(nach: Update der S3 Leitlinie, AWMF-Register-Nr.: 021/012)

1. 8 Die Gallensalzexportpumpe BSEP

Die Bile Salt Export Pump (BSEP, ABCB11, cBAT), früher auch Sister of P-Glycoprotein (SPGP) genannt, gehört zur Superfamilie der ATP-Binding-Cassette-(ABC-) Transporter, der ebenfalls das Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2, cMOAT), das P-Glykoprotein MDR1 (PGP) und die Phospholipid-Flippase MDR3 angehören [79, 80]. Alle diese Transporter gemein ist das ABC-Motiv, das für die Bindung von ATP verantwortlich ist.

Die humane BSEP-cDNA enthält 3.966 kodierende Basenpaare bei einer Transkriptlänge von 5.036 bp und codiert ein 1321 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer Molekularmasse von 140-170 kDa [81, 82, 83]. Das BSEP-Protein besteht - wie alle ABC-Transporter - aus zwei homologen, durch die Linker-Region miteinander verbundenen Hälften mit je sechs Transmembrandomänen und je einer Nukleotidbindungsstelle [84] (Abb. 1.6). Die Nukleotidbindungsstellen ermöglichen

durch die Hydrolyse von ATP die Energie zum transmembranären Transport. Ihre Walker-A- und -B-Motive sind in verschiedenen ATP-abhängigen Enzymen hochgradig konserviert [85]. Für die Substratbindung sind die Transmembrandomänen verantwortlich [86].

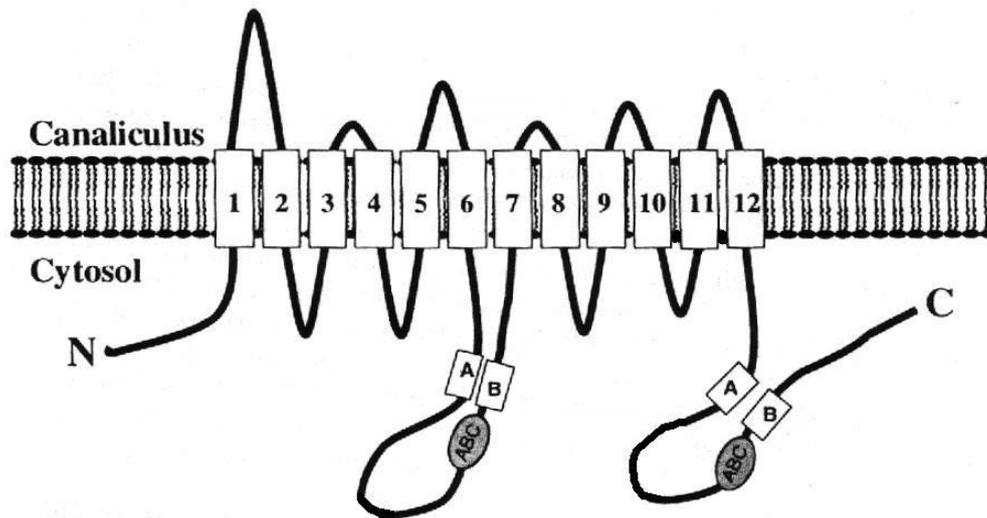


Abb. 1. 6 Struktur des BSEP-Proteins (nach Faber et al. [84])

Die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) enthält 12 Transmembrandomänen (1-12) und zwei Nucleotidbindungsstellen (ABC) mit den hochgradig konservierten Walker-A- und -B-Motiven (A / B).

1.9 Funktion der Gallensalzpumpe BSEP

Die *Bile Salt Export Pump* (BSEP) ist der wichtigste apikale Gallensalztransporter und kommt in Hepatozyten ausschließlich an der kanalikulären Membran vor, konnte aber auch im Hirngewebe (graue Substanz) und in der Darmmukosa auf RNA-Ebene nachgewiesen werden [87, 88, 89]. BSEP bewirkt die Sekretion von Gallensalzen in die Canaliculi biliferi (Gallekanälchen) welches ein ATP-abhängigen Prozess ist, zu denen vor allem Taurochenodeoxycholat (TCDC), Taurocholat (TC), Tauroursodeoxycholat (TUDC), Glykocholat (GC) und Cholat (in absteigender Transportrate bzw. ansteigender K_m) gehören [87, 90, 91]. Es handelt sich hierbei um den die Ausscheidungsrate bestimmenden Schritt in der Gallensalzsekretion, da ein großer Konzentrationsgradient (100-1000fach) zwischen Sinusoidalblut und Galle überwunden werden muss [92, 93]. Es konnte durch Lecureur et al. auch eine Beteiligung von BSEP an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika

nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei anderen ABC-Transportern [94]. BSEP wird - wie andere Proteine auch - im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat synthetisiert bzw. modifiziert und dann in Vesikeln zur kanalikulären Membran transportiert. Der Gallensalztransporter ist möglicherweise bei diesem Vorgang bereits aktiv und führt zur Aufnahme von Gallensalzen, die dann bei Fusion der Vesikel mit der kanalikulären Membran in die Canaliculi biliferi sezerniert werden [95]. Eine hohe intrazelluläre Konzentration hydrophober Gallesalze kann Zellnekrose induzieren und mitochondriale Dysfunktionen aufgrund einer Detergenz-ähnlichen Wirkung hervorrufen. Veränderungen von ABCC11 auf der genetischen Ebene, dem Gen der BSEP, bedingen die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2), eine autosomal-rezessiv vererbte schwere cholestatische Lebererkrankung, die sich bereits im ersten Lebensjahr manifestieren kann [96, 97]. Sie zeichnet sich durch eine Senkung der totalen Gallensalzsekretionsrate auf etwa 1 % bei normalem Cholesterin und normaler g-Glutamyltransferase (gGT) im Serum aus [98, 99]. Diese Erkrankung führt unbehandelt innerhalb der ersten Lebensjahre zu einer letalen cholestatischen Leberzirrhose. ABCC11 ist auf Chromosom 2q24 lokalisiert [100]. Bislang sind mindestens 150 BSEP-Mutationen bekannt [96, 101, 102]. Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass es bei dieser Erkrankung häufig zu einem Fehlen von BSEP an der kanalikulären Membran kommt [102, 103, 96]. Auch ist BSEP bei durch Medikamente, Sepsis und Schwangerschaft induzierter Cholestase sowie bei entzündlichen Leber- und Gallenwegserkrankungen involviert [104 - 108]. Außerdem handelt es sich bei dem BSEP-Gen um ein zur Gallensteinentwicklung prädisponierendes Gen, das zu den sog. Lith-Genen gehört [109, 110].

1.10 Genetische Polymorphismen

Als Polymorphismus bezeichnet man im Fachgebiet Genetik das Auftreten einer oder mehrerer Genvarianten (das heißt: eines oder mehrerer Allele) innerhalb einer Population. Definitionsgemäß muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariante (die Allelfrequenz) größer als ein Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen. Für das Auftreten der Genvariationen sind drei häufige Arten der Sequenzveränderungen beschrieben:

1) Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)

2) Insertions- und Deletionspolymorphismen

3) Multiplikationen

Die häufigsten Sequenzvariationen sind die Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), bei denen es zum Austausch eines einzelnen Nukleotides in einer DNA-Sequenz kommt. Bei dem von uns untersuchten Polymorphismus handelt es sich um einen SNP mit einem Austausch an der Position 1331 der kodierenden Nukleotidsequenz von BSEP des Thymins (T) durch Cytosin (C) (c.1331T>C), welches auf Proteinebene zum Austausch des Valin an Position 444 durch Alanin führt (p. V444A).

Unter einer *Insertion* oder - dem Gegenteil - einer *Deletion* versteht man den Einbau bzw. den Verlust von mindestens einem Nukleotid. Befindet sich die Insertion oder Deletion im kodierenden Bereich eines Gens (Exon), kann dies zu einem funktionellen Aktivitätsverlust des betroffenen Allels führen.

Multiplikationen (Verdoppelungen, Vervielfachungen) betreffen schließlich das gesamte Gen. Dies kann zu einer erheblichen Erhöhung der Stoffwechselkapazität des betroffenen Genprodukts führen.

1.11 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

In der Therapie der chronischen Hepatitis C Virus Infektion wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Jedoch gelingt es nicht mit den aktuell zur Verfügung stehenden Medikamenten bei allen Patienten eine Ausheilung der Erkrankung zu erreichen. Aus großen Studien konnten prädiktive Faktoren (z. B. Alter, Geschlecht, HCV Genotyp, Dauer der Erkrankung u. a.) identifiziert werden, die mit einem Therapieansprechen assoziiert sind. Neben den erwähnten epidemiologischen Faktoren zeichnet sich ein Trend zur Identifikation von genetischen Faktoren auf. Hier ist der Polymorphismus für das Interleukin 28B zu nennen. Des Weiteren ist bekannt, dass Patienten mit einer cholestatischen Konstellation (erhöhtes Bilirubin und/oder erhöhte gamma-GT) schlechter auf eine Kombinationstherapie ansprechen. Der Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe kann ebenfalls zu einer cholestatischen Konstellation führen. In dieser retrospektiven Studie sollte der Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP auf das Therapieansprechen bei therapie-naiven Patienten, die eine PEG-Interferon/Ribavirin Kombinationstherapie erhalten hatten, untersucht werden.

Material und Methoden

2.1 Patienten

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Daten und Materialien von Patienten (n=352) mit chronischer Hepatitis C analysiert. Eine chronische Hepatitis C wurde durch den Nachweis von HCV-RNA über 6 Monate definiert. Das Patientenkollektiv stellen die Patienten der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie dar. Es wurden alle therapienaiven Patienten, bei denen eine Kombinationstherapie PEG-IFN und Ribavirin im Zeitraum von 2003 bis 2008 durchgeführt wurde, eingeschlossen (Studiennummer 2875; Datum des Ethikvotums 21.03.2007).

2.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten 366 gesunde Blutspender, die der genetischen Untersuchung zugestimmt hatten.

2.3 Klinische und serologische Testverfahren

Die Bestimmung von serologischen Markern und der Virusnachweis der HBV- und HCV-Infektion (HBsAg, HBeAg, anti-Hbs-Antikörper, anti-HBc-Antikörper, anti-HBe-Antikörper, HDV-Antikörper, HCV-Antikörper, HBV-DNA, HCV-RNA) erfolgte mittels kommerzieller Assays. Die HCV-Genotypisierung erfolgte nach der Klassifikation von Simmonds et al. nach PCR Amplifikation mit einem kommerziellen Test (Innolipa, Innogenetics, Heiden) durch das Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf.

Der AST/Thrombozyten-Ratio-Index (APRI)-Score wurde im Rahmen der Evaluierung der Leberzirrhose gemäß folgender Formel berechnet: Verhältnis von gemessener GOT (U/l) zum Referenzwert (U/l) geteilt durch Thrombozyten ($10^9/l$) x 100.

2.4 Therapieendpunkte

Primärer Endpunkt war die anhaltende Elimination der HCV-RNA aus dem Serum 6 Monate nach Beendigung der Therapie (sustained virological response, SVR). Sekundärer Endpunkt war die Viruselimination am Ende der Therapie (end of treatment response, ETR).

2.5 Bestimmung des V444A Polymorphismus

Nach Isolierung der genomischen DNA mittels eines kommerziellen Kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden) wurde der V444A Polymorphismus der Gallensalzexportpumpe BSEP durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Hierzu erfolgte die Amplifikation mittels Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Das Primerpaar bestand aus den folgenden Einzelprimern.

- 1) Vorwärtsprimer: 5'-agattctaaatgacctcaacatg-3'
- 2) Rückwärtsprimer: 5'-agagctgtcatttccct-3'

Nach Abschluss der Reaktion erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Dazu wurde das PCR-Produkt von 50°C auf 95°C kontinuierlich erhitzt und die Fluoreszenz gemessen. Aus der Änderung der Fluoreszenzintensität pro Temperaturänderung ($\Delta F/\Delta T$) wurde die charakteristische Schmelzkurve ermittelt. Bei Vorliegen des Wildtyps (VV; Abb. 2.5.1) zeigt sich ein Peak bei 64°C und bei Vorliegen des homozygoten Polymorphismus (AA; Abb. 2.5.3) einen Peak bei 65°. Die Heterozygotie zeigt einen Doppelpeak (Abb. 2.5.2).

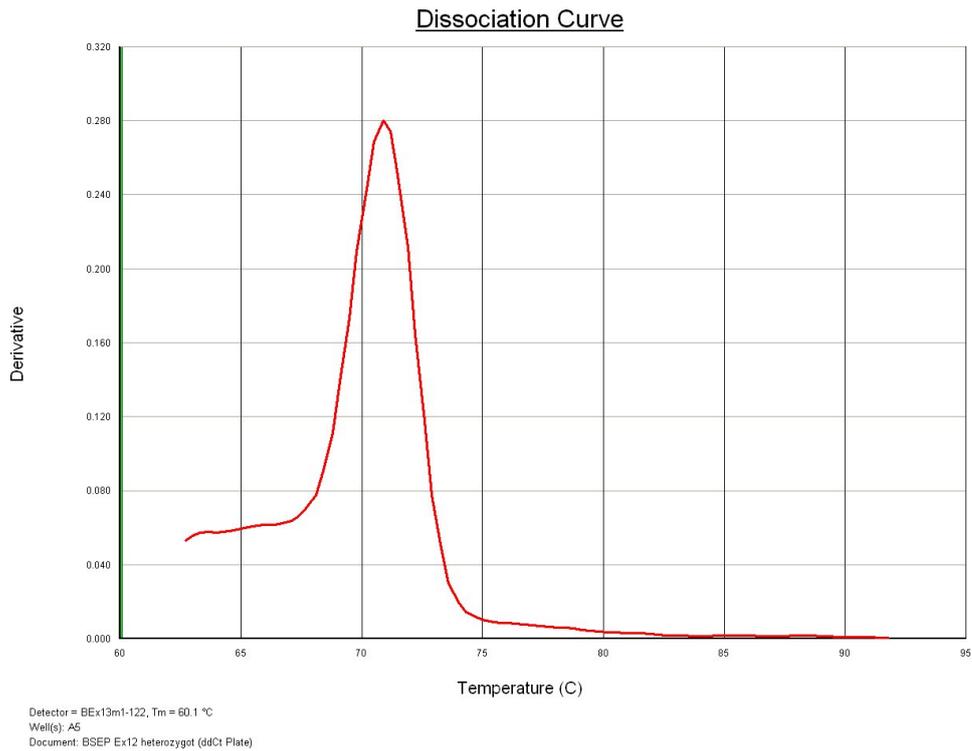


Abb. 2.5.1 Schmelzkurve für den Wildtyp des SNP V444A des Gens ABCB11 der Gallensalzexportpumpe

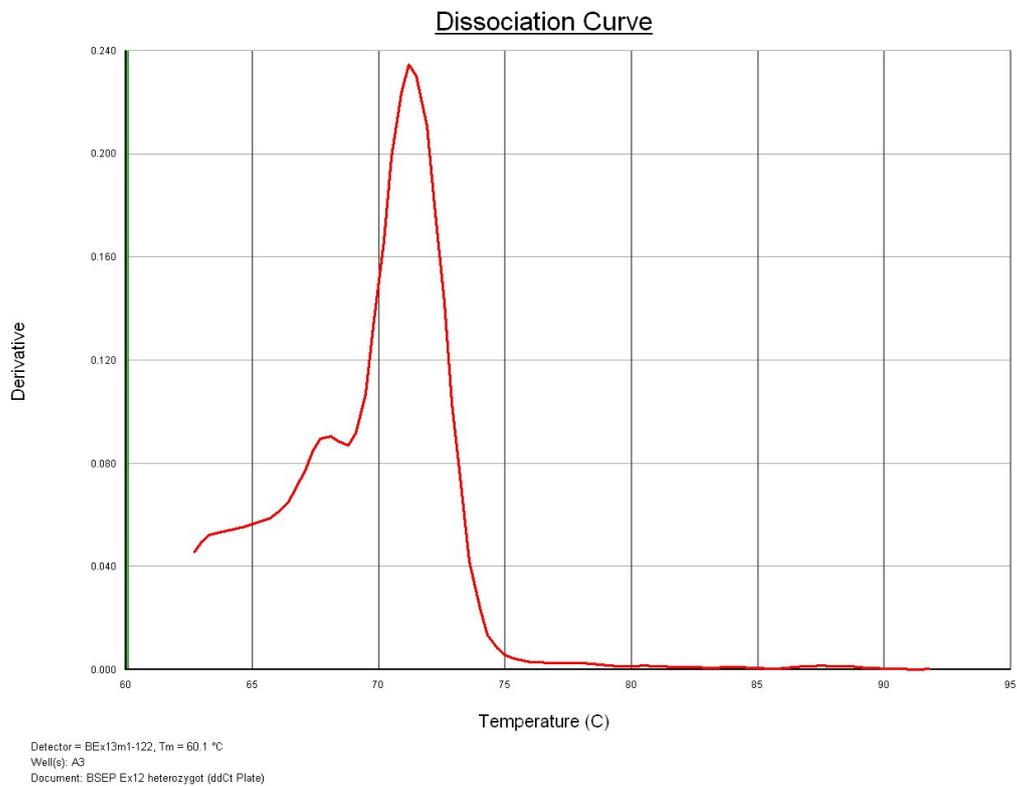


Abb. 2.5.2 Schmelzkurve für die Heterozygotie von V444A (ABCB11) mit dem typischen Doppelpeak

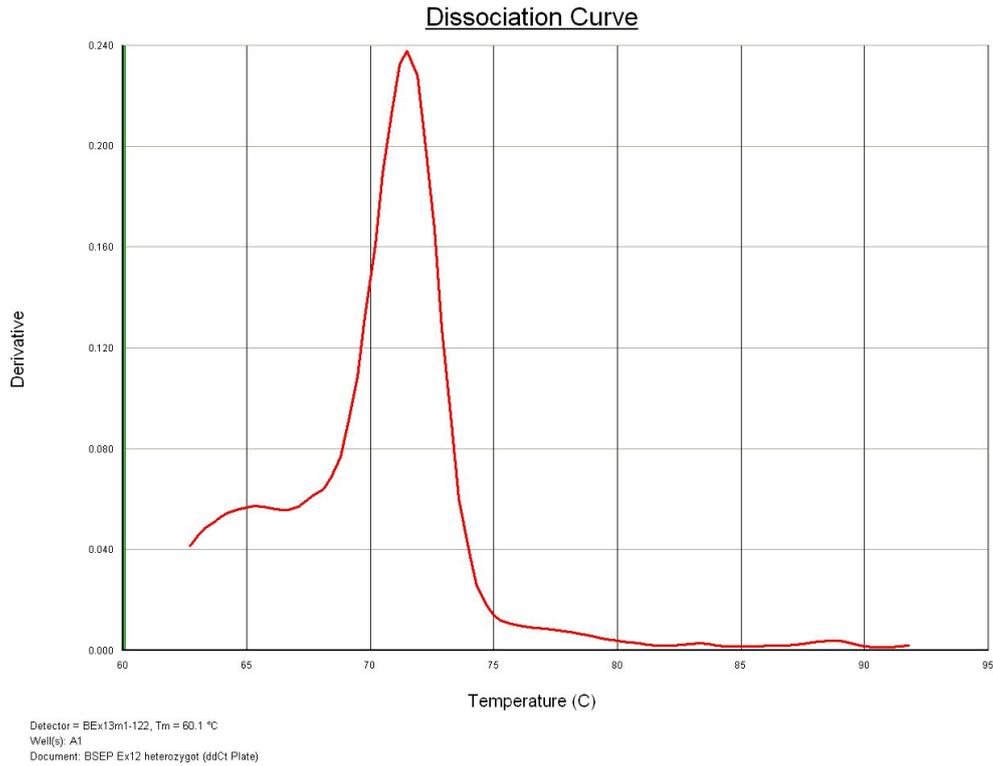


Abb. 2.5.3 Schmelzkurve für das Vorliegen einer Homozygotie des C-Allels SNP V444A von ABCB11

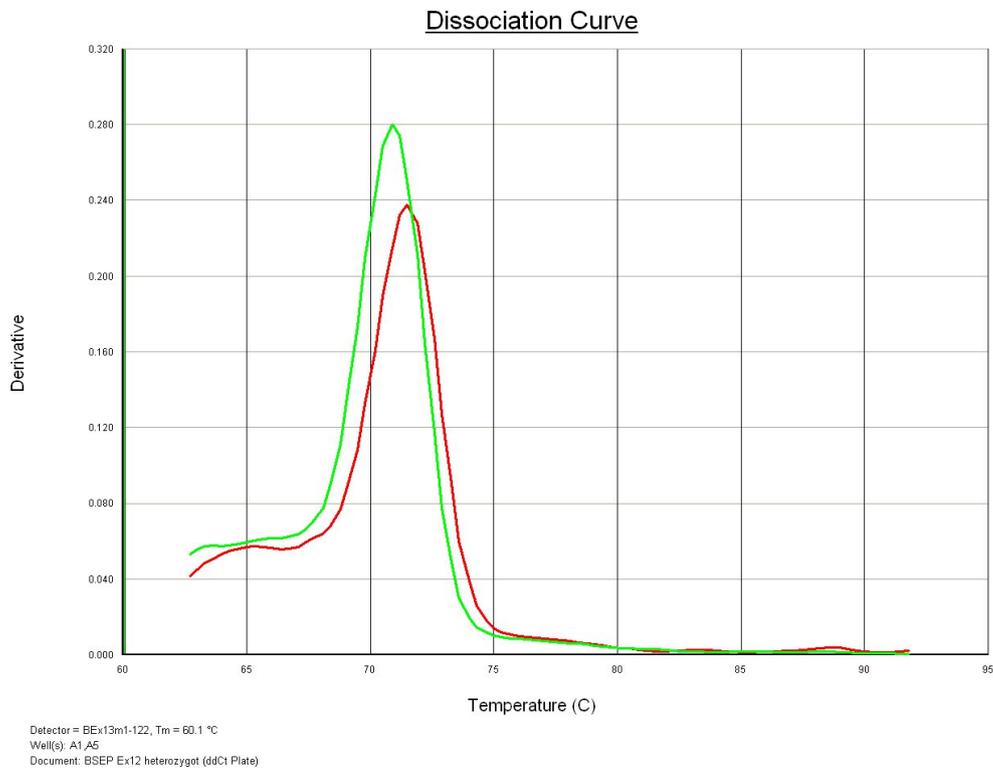


Abb. 2.5.4 Schmelzkurven für den Wildtyp (1. Peak) und die Homozygotie (2. Peak) für den Polymorphismus V444A

2.6 Statistische Verfahren

Alle für die Therapie relevanten Daten wurden in einer Tabelle erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 12.0, Inc., München, Deutschland). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. χ^2 -Test überprüft. Zur Ermittlung von unabhängigen prädiktiven Faktoren für das Therapieansprechen wurde eine logistische Regression durchgeführt. Der Vergleich der Allelhäufigkeit in der Studiengruppe und der Kontrollgruppe erfolgte durch die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0.05$ gewählt.

Ergebnisse

3.1. Patienten

Im Zeitraum von 2004 und 2008 wurde bei 352 therapienaiven Patienten der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine Kombinationstherapie empfohlen und durchgeführt. Die Tabelle 3.1 gibt die Charakteristika des Patientenkollektivs wieder.

Männlich, n (%)	178 (50,6%)
Alter (MW \pm STD)	48 \pm 12
GPT (U/l), (MW \pm STD)	100 \pm 87
GOT (U/l), (MW \pm STD)	69 \pm 52
GGT (U/l), (MW \pm STD)	72 \pm 76
Bilirubin (mg/dl), (MW \pm STD)	0,71 \pm 0,42
HCV-RNA (U/ml), (MW \pm STD)	1.672.180 \pm 5.185.444
HCV-Genotyp, n (%)	
1	275 (78,1%)
2	24 (6,8%)
3	45 (12,8%)
4	6 (1,7%)
5	1 (0,3%)
fehlend	1 (0,3%)

Tab 3.1 Charakteristika der Patienten (n=352) vor Therapieeinleitung

3.2 Therapieansprechen aller Patienten

Am Ende der Therapie konnte bei 254 Patienten das HCV nicht mehr nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Ansprechquote von 72,2% (ETR). Während der Nachbeobachtungszeit kam es bei 100 Patienten zu einem Rückfall (39,4%), so dass es bei 154 (43,8%) Patienten zu einem anhaltenden Therapieerfolg (SVR) gekommen ist.

Es ist bekannt, dass Patienten mit einem HCV Genotyp 2 oder 3 besser auf eine Kombinationstherapie ansprechen als Patienten mit einem HCV Genotyp 1 oder 4.

Die Ansprechquote für Patienten mit HCV Genotyp 2 oder 3 lag am Ende der Therapie bei 88,4% (61 von 69) im Vergleich zu 68,3% bei Patienten mit einem HCV Genotyp 1 oder 4 (192 von 281) deutlich höher ($p=0.001$). Dieser signifikante Unterschied war auch sechs Monate nach Beendigung der Therapie erhalten. Die SVR für Patienten mit HCV Genotyp 2 oder 3 lag bei 71% (49 von 69) gegenüber 37,0% (104 von 281) bei Patienten mit HCV Genotyp 1 oder 4. Die Ansprechquoten sind in Abb.3.1 dargestellt

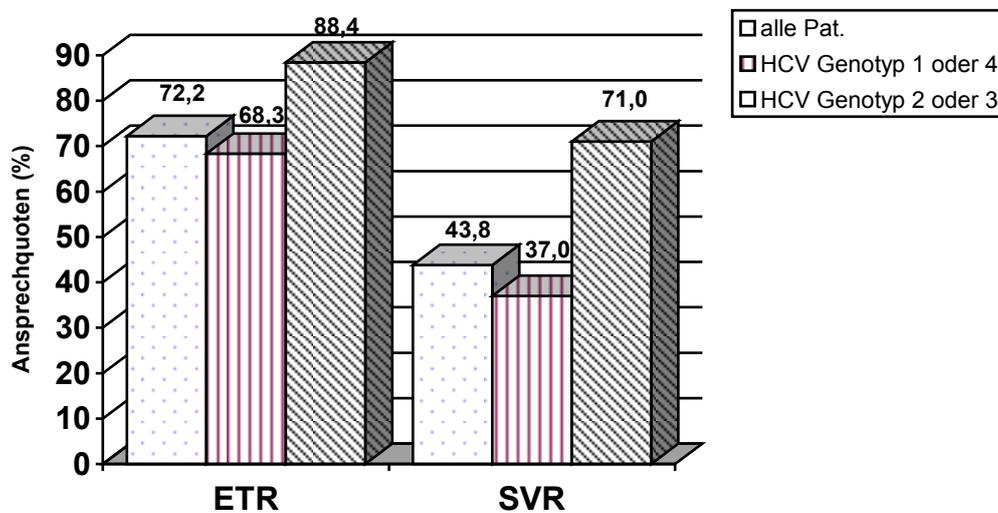


Abb. 3.1 Ansprechquoten aller Patienten (in %) und entsprechend der HCV Genotypen am Ende der Therapie (ETR) und Ende der Nachbeobachtungszeit (SVR)

3.3. Prävalenz des Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP

Es fanden sich folgende Prävalenzen des Polymorphismus V444A für die 352 Patienten mit einer HCV-Infektion:

Wildtyp (VV): 43 (12,2%)
 Heterozygotie (VA): 174 (49,4%)
 Homozygotie (AA): 135 (38,4%)

Im Vergleich fanden sich bei dem Kontrollkollektiv (n=366) folgende Prävalenzen:

Wildtyp (VV): 43 (11,7%)
 Heterozygotie (VA): 171 (46,7%)
 Homozygotie (AA): 152 (41,5%)

Die Berechnung des Hardy-Weinbergs-Gleichgewichts zeigte keinen Unterschied in der Allelverteilung beider Gruppen.

3.4 Therapieansprechen in Abhängigkeit des V444A Polymorphismus

Zur Beurteilung des Einflusses des V444A Polymorphismus wurden die Patienten entsprechend ihres Polymorphismus unterteilt. Die erste Gruppe stellt die Patienten mit dem Wildtyp (VV) dar, die zweite Gruppe die Patienten mit dem heterozygoten (VA) und homozygoten Polymorphismus (AA). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Baseline Charakteristika zwischen den beiden Gruppen. In Tab. 3.2 sind die Charakteristika vor Therapie wiedergegeben.

	Wildtyp (TT; n=43)	Hetero- /Homozygotie (TC und CC; n=309)	p- Wert
Männlich	55.8% (24/43)	49.8% (154/309)	0.52
Alter (Jahre)	50.2 ± 10.3	47.4 ± 12.4	0.11
GPT (U/l)	87.1 ± 58.1	101.9 ± 89.9	0.42
GOT (U/l)	58.8 ± 39.2	70.8 ± 53.3	0.18
GGT (U/l)	60.5 ± 62.1	73.9 ± 77.2	0.16
Bilirubin (mg/dl)	0.73 ± 0.42	0.71 ± 0.42	0.83
γ-Globuline (g/dl)	1.51 ± 0.64	1.38 ± 0.42	0.34
Thrombozyten (*10³/μl)	205.6 ± 74.3	219.1 ± 123.0	0.65
HCV-RNA (*10⁶ U/ml)	1.50 ± 1.77	1.70 ± 5.48	0.06
HCV-Genotyp 1/4	86% (37/43)	79.0% (244/309)	0.32
APRI > 2	10.5% (4/38)	15.3% (41/268)	0.48

Tab. 3.2 Charakteristika vor Therapie in Abhängigkeit des V444A Polymorphismus.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist in der rechten Spalte wiedergegeben. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede. Beim SNP c.1331T>C (p.V444A) entspricht das T-Nukleotid dem Wildtyp und das C-Allel dem Polymorphismus.

Am Ende der Therapie (ETR) konnte bei 37/43 (86,0%) der Patienten mit dem Wildtyp keine HCV-RNA mehr nachgewiesen werden. In der zweiten Gruppe war dies in 217/309 (70,2%) der Fall. Dieser Unterschied war auf einem Niveau von $p=0,044$ signifikant. Am Ende der Nachbeobachtungszeit (SVR) war bei 26/43 (60,5%) keine HVC-RNA nachweisbar im Vergleich zu 128/309 (41,4%). Auch hier fand sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,022$; Abb. 3.3).

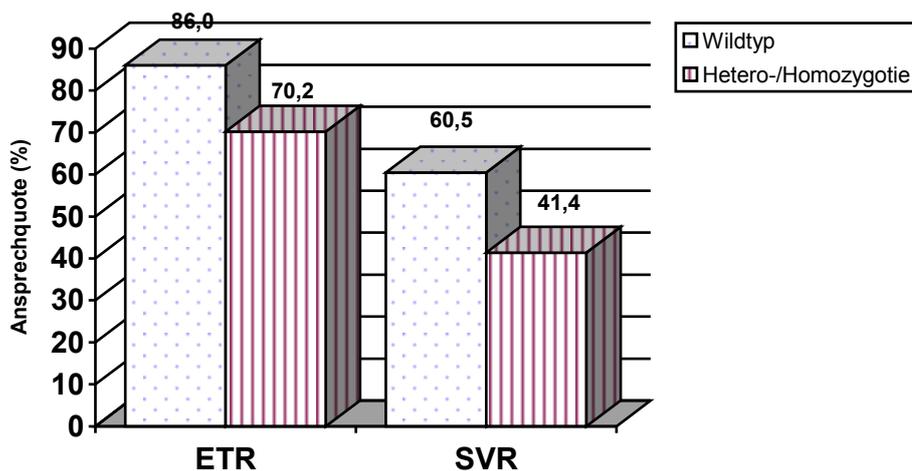


Abb. 3.3 Therapieansprechquoten in Abhängigkeit des V444A Polymorphismus

3.5 Multivariate Analyse

Um den Polymorphismus V444A als unabhängigen Faktor für das Therapieansprechen zu untersuchen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Zusätzlich zu dem Polymorphismus wurden folgende Parameter, deren Einfluss auf das Therapieansprechen bekannt ist, eingeschlossen: Alter (kleiner/größer 40 Jahre), Geschlecht, HCV-RNA (kleiner/größer 400.000 U/ml), HCV Genotyp (1/4 vs. 2/3), Thrombozyten ($< 150.000/\mu\text{l}$). Wie in der vorangegangenen Untersuchung beschrieben, unterschieden sich beide Kollektive nicht voneinander. Die Tabelle 3.3 zeigt das Ergebnis der Analyse zum Ende der Therapie (ETR).

	p-Wert	OR	95% Konfidenzintervall
Geschlecht	0.147	1.44	0.879 – 2.372
Alter	0.458	1.24	0.700 – 2.205
HCV-RNA	0.129	0.66	0.380 – 1.131
HCV-Genotyp	0.002	0.29	0.129 – 0.642
BSEP – SNP	0.015	3.11	1.241 – 7.805
Thrombozyten	0.022	2.18	0.118 – 4.256

Tab. 3.3 Multivariate Analyse zum Ende der Therapie; OR=odds ratio

Als unabhängige Faktoren für das Therapieansprechen finden sich hier der HCV-Genotyp, der V444A Polymorphismus und die Thrombozyten. Im weiteren Schritt wurde die Analyse mit den gleichen Faktoren für das anhaltende Therapieansprechen durchgeführt (SVR; Abb. 3.4).

	p-Wert	OR	95% Konfidenzintervall
Geschlecht	0.556	1.15	0.726 – 1.813
Alter	0.494	0.84	0.497 – 1.401
HCV-RNA	0.030	0.59	0.361 – 0.949
HCV-Genotyp	< 0.001	0.25	0.138 – 0.456
BSEP – SNP	0.002	2.94	1.476 – 5.872
Thrombozyten	0.162	1.63	0.822 – 3.214

Tab. 3.4 Multivariate Analyse zum Ende der Nachbeobachtungszeit; OR=odds ratio

Für das anhaltende Therapieansprechen stellen sich die HCV-RNA, der HCV-Genotyp und der V444A Polymorphismus als unabhängige Faktoren dar.

3.6 Einfluss des Polymorphismus V444A auf das Therapieansprechen in Abhängigkeit des HCV Genotyps

Im untersuchten Patientenkollektiv fanden sich insgesamt 281 Patienten, die mit den HCV-Genotypen 1 oder 4 infiziert waren. Beide Gruppen (Patienten (VV) vs. (VA und AA) unterschieden sich, außer in Bezug auf die GGT hinsichtlich ihrer Charakteristika nicht (Tab. 3.5).

	Wildtyp (n=37)	Hetero-/Homozygotie (n=244)	p-Wert
Männlich	51,4% (19/37)	47,5% (116/244)	0,73
Alter (Jahre)	50, 7 ± 9,4	48,8 ± 12,4	0,42
GPT (U/l)	86,6 ± 58,5	97,5 ± 81,7	0,63
GOT (U/l)	60,5 ± 41,4	69,6 ± 48,4	0,34
GGT (U/l)	55,8 ± 61,3	78,7 ± 82,3*	0,03
Bilirubin (mg/dl)	0,67 ± 0,41	0,72 ± 0,43	0,20
Thrombozyten (*10³/μl)	209,0 ± 74,4	217,6 ± 133,1	0,95
HCV-RNA (10⁶ U/ml)	1.68 ± 1.89	1.88 ± 6.11	0,08
APRI > 2	12.5% (4/32)	16.3% (34/209)	0,62

Tab. 3.5 Charakteristika der Patienten mit einem HCV Genotyp 1 oder 4 in Abhängigkeit des V444A Polymorphismus.

Es fand sich ein signifikanter Unterschied zum Ende der Therapie 31/37 (83,8%) im Vergleich zu 161/244 (65,9%) zu Gunsten der Patienten mit dem Wildtyp (p=0,036). Dieser Unterschied blieb auch am Ende der Nachbeobachtungszeit (SVR) bestehen (23/37 (62,2%) vs. 81/245 (33,2%); p=0,001). Zusätzlich zu den Ansprechquoten fand sich ein signifikanter Unterschied in den Rückfallquoten (8/31 (25,8%) vs. 80/161 (49,7 %); p=0,018) mit weniger Rückfällen bei den Patienten mit dem Wildtyp (Abb. 3.4).

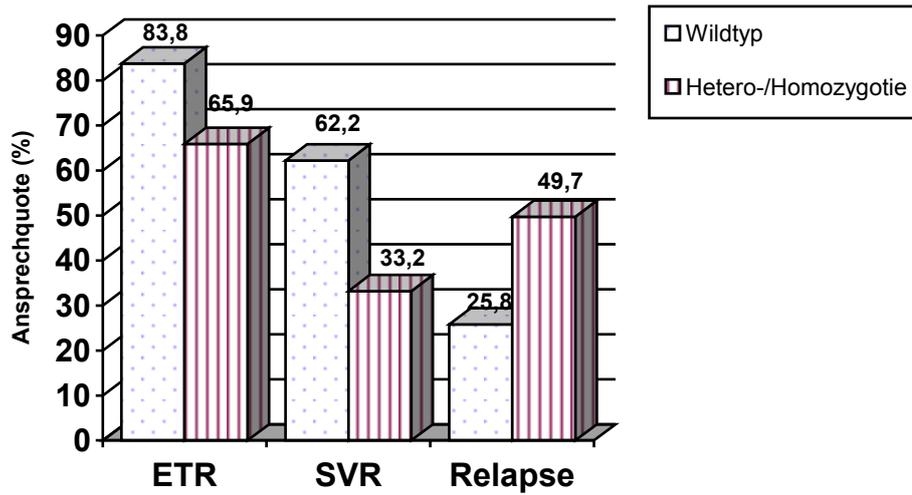


Abb. 3.4 Einfluss des V444A Polymorphismus von BSEP auf die Ansprechquoten für Patienten, die mit den HCV Genotypen 1 oder 4 infiziert waren.

Für Patienten mit den HCV Genotypen 2 oder 3 (n=69) fand sich kein Einfluss des Polymorphismus auf das Therapieansprechen (ETR: 6/6 (100%) vs. 55/63 (87,3%); p=0,603. SVR: 3/6 (50,0%) vs. 46/63 (73,0%); p=0,346).

3.7 Subgruppenanalyse

In den ersten Untersuchungen wurden die Patienten mit einer Heterozygotie bzw. einer Homozygotie für den Polymorphismus V444A zusammen gefasst. Im nächsten Schritt wurden diese Gruppen separat analysiert, um den möglichen „Dosisseffekt“ des V444A-Polymorphismus zu untersuchen.

3.7.1 V444A Wildtyp im Vergleich zu V444A Heterozygotie

Beide Gruppen unterschieden sich bezüglich ihrer Charakteristika vor Einleitung der Therapie nicht (Tab. 3.6).

	Wildtyp (n=43)	Heterozygotie (n=174)	P
Männlich	24 (55,8%)	91 (52,0%)	0,74
Alter (Jahre)	50,2 ± 10,3	46,8 ± 12,5	0,08
GPT (U/l)	87,2 ± 58,2	104,9 ± 103,5	0,49
GOT (U/l)	58,8 ± 39,2	72,3 ± 58,1	0,22
GGT (U/l)	60,5 ± 62,1	77,1 ± 78,9	0,12
Bilirubin (mg/dl)	0,73 ± 0,43	0,74 ± 0,48	0,69
Thrombozyten (*10³/μl)	205,55 ± 74,3	224,5 ± 149,3	0,57
HCV-RNA	1 496 782 ± 1 772 815	1 970 491 ± 6 725 308	0,17
HCV Genotypen 1/4	37 (86%)	142/173 (80,1%)	0,65

Tab. 3.6 Charakteristika der Patienten mit dem Wildtyp bzw. Heterozygotie für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP

Zwischen diesen beiden Gruppen (Wildtyp VV vs. Heterozygotie VA) fand sich ein signifikanter Unterschied in den Therapieansprechquoten zum Ende der Therapie (ETR) (37/43 (86,0%) vs. 120/174 (68,9%); p=0,023), als auch zum Ende der Nachbeobachtungszeit SVR (26/43 (60,4%) vs. 74/174 (42,5%), p=0,040). Die Rückfallquote war in der Gruppe der Heterozygoten höher (46/120 (38,3%)) als bei der Gruppe mit dem Wildtyp (11/37 (29,7%)) erreichte jedoch nicht die statistische Signifikanz (p=0,435; Abb. 3.5).

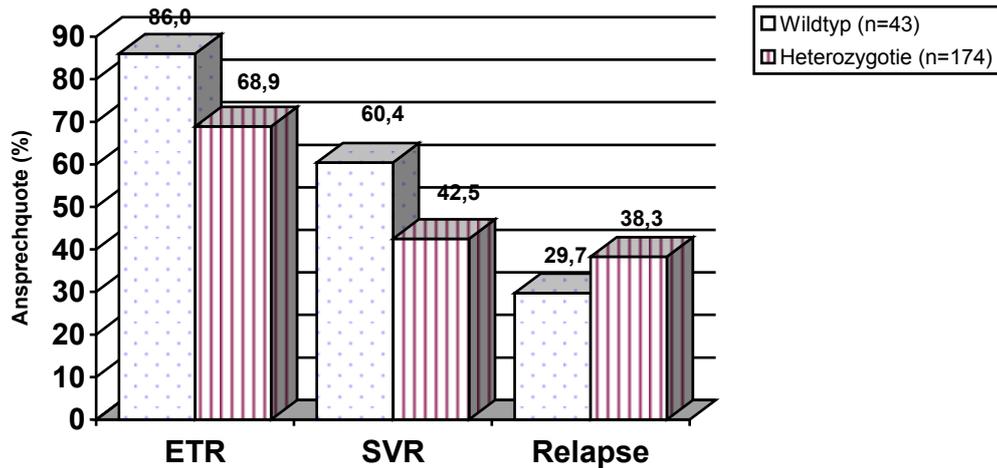


Abb. 3.5 Therapieansprechen der Patienten mit dem Wildtyp im Vergleich zu Patienten mit einer Heterozygotie für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP.

3.7.2. V444A Wildtyp im Vergleich zu V444A Homozygotie

Bei dieser Analyse fanden sich höhere Therapieansprechquoten zum Ende der Therapie in der Wildtypgruppe (37/43 (86,0%) vs. 98/135 (72,6%); $p=0,101$) und zum Ende der Nachbeobachtungszeit (26/43 (60,4%) vs. 54/135 (40,0%), $p=0,022$). Der Unterschied war jedoch nur am Ende der Nachbeobachtungszeit signifikant. Die Rückfallquoten in beiden Gruppen unterschieden sich statistisch nicht (11/37 (29,7%) vs. 44/98 (44,9%), $p=0,121$; Abb. 3.6).

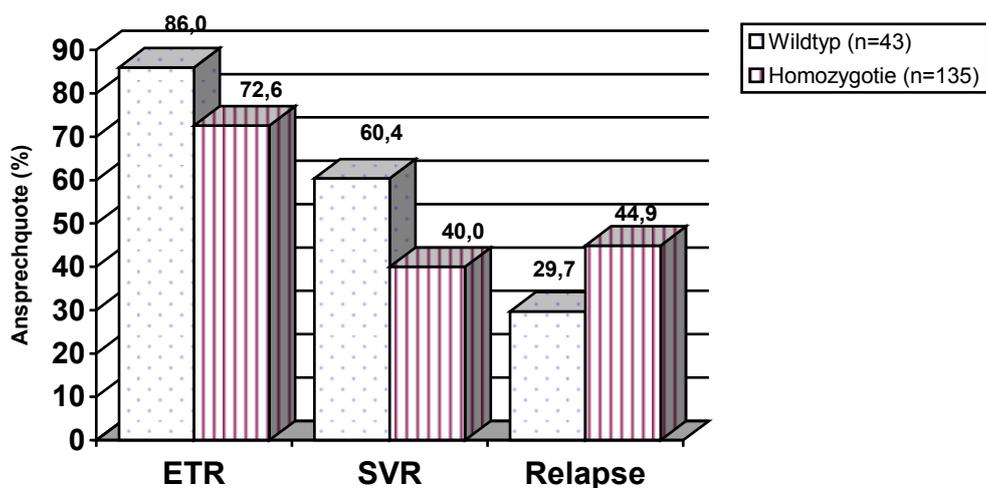


Abb. 3.6 Therapieansprechen der Patienten mit dem Wildtyp im Vergleich zu Patienten mit einer Homozygotie für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP.

3.7.3 V444A Heterozygotie im Vergleich zu V444A Homozygotie

In den beiden Gruppen lagen die Ansprechquoten nahe beieinander, so dass sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte (ETR: 120/174 (68,9%) vs. 98/135 (72,6%); $p=0,455$; SVR: 74/174 (42,5%) vs. 54/135 (40,0%); $p=0,728$; Rückfallquote (Relapse; 46/120 (38,3%) vs. 44/98 (44,9%); $p=0,337$; Abb. 3.7).

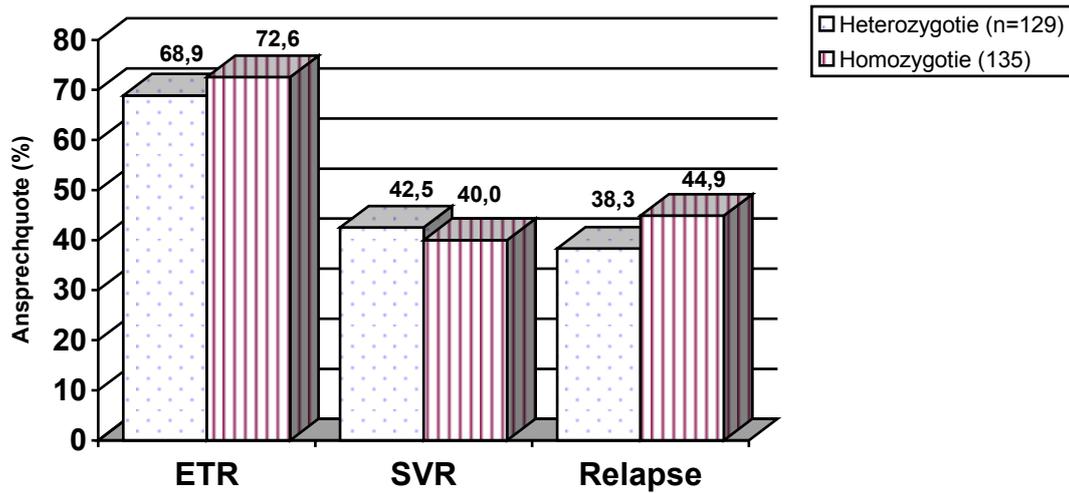


Abb. 3.7 Therapieansprechen der Patienten mit der Heterozygotie im Vergleich zu Patienten mit einer Homozygotie für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP.

4. Diskussion

4.1 Therapieansprechen insgesamt

In den vergangenen Jahren ist es zuerst durch die Zugabe von Ribavirin und anschließend durch die Einführung des pegylierten Interferons zu einem deutlichen Anstieg der Therapieansprechquoten bei der Behandlung der chronischen Hepatitis C Virusinfektion gekommen. Während bei einer IFN-Monotherapie Ansprechquoten von höchstens 20% erreicht wurden, konnten mit der Kombination des IFNs mit Ribavirin ein Anstieg der Therapieansprechquoten auf knapp 50% erzielt werden. Es zeigte sich hierbei, dass deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von den HCV Genotypen bestehen. Als günstige HCV Genotypen konnten die Genotypen 2 und 3 identifiziert werden, so wie es sich auch in dem in dieser Arbeit untersuchtem Patientenkollektiv darstellt. Bei diesen HCV Genotypen wurden mit der Standard-IFN Kombinationstherapie Ansprechquoten von 75-80% erreicht, wobei hier eine Therapiedauer von 24 Wochen der 48-wöchigen Therapie gleichwertig ist. Der in unseren Breitengraden am häufigsten beobachtete HCV Genotyp 1 zeigt ein deutlich schlechteres Ansprechen auf eine Standard-IFN Kombinationstherapie mit einem dauerhaften Ansprechen von ca. 45% bei einer 48-wöchigen Therapiedauer. Ein weiterer Schritt in der Verbesserung des Therapieansprechens brachte die Einführung des pegylierten IFNs. Mit der PEG-IFN-Monotherapie wurden vergleichbare Therapieansprechquoten wie mit der Standard-IFN-Kombinationstherapie erreicht. Als logischer Schritt dieser Untersuchungen wurden Studien zur Kombinationstherapie des PEG-IFN mit Ribavirin durchgeführt. Bei diesen Studien führte die PEG-IFN-Kombinationstherapie bei Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert sind, zu einem weiteren Anstieg der Therapieansprechquoten. Patienten, die mit den HCV Genotypen 2 oder 3 infiziert sind, konnten von dieser weiteren Entwicklung nicht so deutlich profitieren wie Patienten mit den HCV Genotypen 1 oder 4.

Von den in unserer Studie untersuchten 352 Patienten waren 281 mit den HCV Genotyp 1 oder 4, 69 mit den HCV Genotypen 2 oder 3 infiziert. Bei 1 Patienten konnte der HCV Genotyp nicht identifiziert werden. Das Ansprechen aller Patient lag bei 55%, welches höher ist als bei einem Patientenkollektiv, aus Patienten mit einem HCV Genotyp 1 oder 4, aber deutlich niedriger ist als bei einem Patientenkollektiv, das nur aus Patienten mit den HCV Genotypen 2 oder 3 besteht.

Am Ende der Nachbeobachtungszeit waren 48% der Patienten mit HCV Genotyp 1 oder 4 virusfrei. Bei den Patienten mit HCV Genotypen 2 oder 3 waren es 72%. Dieser Unterschied war signifikant, welches mit den bekannten Daten übereinstimmt. Die Gesamtansprechquote von 48% der Patienten mit HCV Genotyp 1 oder 4 liegt höher als die beschriebenen Ansprechquoten mit einer IFN-Standard-Kombinationstherapie aber niedriger als die Ansprechquoten mit einer PEG-IFN-Kombinationstherapie [71-73].

4.2 Untersuchung des Patientenkollektivs auf Repräsentativität

Um alle folgenden Untersuchungen für das Patientengut der HCV-Infizierten weiter einzuordnen, wurde die Allgemeingültigkeit der Studie untersucht. Hierfür wurde der Einfluss bekannter Faktoren, die mit einem Therapieansprechen assoziiert sind, untersucht. Als Prädiktoren eines Therapieansprechens Faktoren konnten in großen Studien folgende Faktoren identifiziert werden [72]:

1. weibliches Geschlecht
2. Alter kleiner als 40 Jahre
3. HCV Genotypen 2 oder 3
4. Infektionsdauer weniger als 5 Jahre
5. Viruslast < 2.000.000 Kopien/ml

Da der Infektionszeitpunkt häufig unbekannt ist, wurde dieser Parameter nicht berücksichtigt. In unserer Studie zeigte sich, dass das Alter und der HCV Genotyp als unabhängige bekannte Parameter mit dem Ansprechen assoziiert sind. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unser Patientenkollektiv repräsentativ für HCV-infizierte Patienten ist.

4.3 Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP auf das Therapieansprechen

Die Gallensalzexportpumpe BSEP ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen intra- und extrazellulären Gallensalzen. Interferon alpha ist, trotz der Entwicklung neuer Substanzgruppen, in der Behandlung der chronischen HCV Infektion ein wichtiger Bestandteil. Gallensalze interferieren mit dem Interferonsignalweg [111]. Weiterhin können erhöhte intrazelluläre Gallensalzkonzentration einen proapoptischen Status der Zellen induzieren, der unabhängig vom so genannten Todesrezeptor CD 95 ist [112].

Der Einfluss von Gallensalzen im Serum auf das Therapieansprechen bei Patienten mit einer chronischen HCV Infektion konnte im Jahr 2005 durch eine retrospektive Studie nachgewiesen werden [113]. In dieser Studie wurden die Gallensalzkonzentration von 35 Gesunden und 50 Patienten mit einer HCV Infektion verglichen. Die Gallensalzkonzentration war im Serum der Gesunden niedriger als bei den HCV Patienten. Bei der weiteren Analyse zeigte sich eine niedrigere Gallensalzkonzentration im Serum bei Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen (n=17) im Vergleich zu Patienten mit einem Rückfall nach primär erfolgreicher Therapie (n=6) oder Nichtansprechern (n=27).

Der Polymorphismus V444A des BSEP wird mit einer verminderten Expression des BSEP assoziiert und könnte damit die intrazelluläre Gallensalzkonzentration modifizieren [114]. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, wie die verminderte Expression des BSEP einen Fluss auf HCV Replikation nehmen könnte. Im Replicon-System, welches in Huh 7 Zellen transfiziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass Gallensäuren die HCV Replikation fördern. Dieser Effekt wurde über den nukleären Farnesoid X Rezeptor (FXR) vermittelt [115, 116]. Die Inhibierung des FXR durch den pharmakologischen Inhibitor Guggulsteron oder siRNA knock-down von FXR führen zu einer verminderten Wirkung der Gallensäuren auf die HCV Replikation [116]. Eine verminderte BSEP Expression, bedingt durch den Polymorphismus, kann über eine verminderte Gallensäureexkretion zu erhöhten intrazellulären Gallensäurekonzentrationen führen, die wiederum über den FXR Signalweg eine verstärkte HCV-Replikation bedingt [117]. Interessanterweise konnte der Einfluss der Gallensäuren auf die HCV-Replikation im Replicon-System in Zellen nachgewiesen werden, die mit dem HCV Genotyp 1b

transfiziert, aber nicht in Zellen, die mit dem HCV Genotyp 2a transfiziert waren [116]. Dieses im Zellsystem beobachtete Phänomen würde unser Ergebnis unterstützen, dass der Polymorphismus der Gallensalzpumpe BSEP bei Patienten, die mit den HCV Genotypen 1 infiziert sind, einen Einfluss auf das Therapieansprechen besitzt, dies jedoch für Patienten mit den HCV Genotypen 2 oder 3 nicht beobachtet werden konnte. In der vorliegenden Untersuchung waren 69 Patienten mit den HCV Genotypen 2 oder 3 infiziert. Von den 69 Patienten besaßen 6 Patienten den homozygoten Wildtyp der Gallensalzexportpumpe BSEP. In den Therapieansprechquoten zeigte sich kein signifikanter Unterschied am Ende der Therapie bei den Patienten mit dem Wildtyp (6/6 (100%) vs. 55/63 (87,3%); $p=0,603$) im Vergleich zu Patienten mit der Heterozygotie oder Homozygotie für die Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP. Auch am Ende der Nachbeobachtungszeit (SVR) bestand kein signifikanter Unterschied der Viruselimination in den beiden Gruppen (3/6 (50,0%) vs. 46/63 (73,0%); $p=0,346$). Möglicherweise ist der fehlende Unterschied durch die kleine Fallzahl der Patienten mit dem Wildtyp bedingt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch mit publizierten Daten von Iwata et al. [118]. In dieser Studie wurde ebenfalls der Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP auf das Therapieansprechen bei Patienten mit einer chronischen HCV Infektion untersucht. Insgesamt gingen hier Daten von 451 Patienten ein. Hier konnte kein Einfluss des Polymorphismus bei Patienten mit einem HCV Genotyp 1, jedoch für Patienten mit einem HCV Genotyp 2 oder 3 (TT 100% vs CC 78%; OR 2.01; $p=0.043$) beobachtet werden. Diese Beobachtung steht nicht nur in Widerspruch mit den in unserer Arbeit erhobenen Daten, sondern auch mit dem in vitro Ergebnis der im Replikon-System erhobenen Resultate. Interessanterweise konnte eine Assoziation von erhöhten Gallensäurespiegeln im Serum mit dem Therapieansprechen nachgewiesen werden. Bei Patienten mit den HCV Genotypen 2 oder 3 war dieser Unterschied mit 5 $\mu\text{mol/l}$ (Therapieansprecher) vs 9 $\mu\text{mol/l}$ (Therapieversager) ($p=0.0001$) signifikant. Für Patienten mit dem HCV Genotyp 1 zeigte sich dieser Einfluss nicht. Über alle HCV Genotypen zeigte sich, dass Patienten mit einem Serum-Gallesäurespiegel über 8 $\mu\text{mol/l}$ in einem signifikant höheren Anteil ein dauerhaftes Therapieansprechen erzielten als Patienten mit einem Serum-Gallesäurespiegel von kleiner als 8 $\mu\text{mol/l}$ (58.3% vs 36.3%; OR 2.48; $p=0.0001$). Die Beobachtung der Studie [118], dass

höhere Serum-Gallesäurespiegel mit einem schlechteren Therapieansprechen assoziiert sind, unterstützt die Hypothese, dass die mit dem V444A Polymorphismus assoziierte eingeschränkte Exkretion der Gallensäuren die Viruselimination beeinflussen kann.

Die Akkumulation der Gallensäuren in der Zelle kann mit dem Interferonweg interferieren [111]. Chenodeoxycholsäure, welche eine der beiden primären von der Leber produzierten Gallensäuren ist, und deren Konjugate können die 2',5' Oligoadenylatsynthetase (OAS) in Leberparenchymzellen und Lymphozyten hemmen [119]. Die OAS wird durch doppelsträngige RNA aktiviert. Die durch die OAS gebildeten Oligoadenylate wiederum aktivieren die RNase L, welche virale und zelluläre RNA degradiert [120]. Somit könnte eine verminderte BSEP Aktivität über antivirale Proteine, wie z. B. OAS, die ihrerseits von Gallesäurespiegeln beeinflusst werden die Virusreplikation modifizieren.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, über den die HCV-Replikation beeinflusst werden könnte, ist der Transkriptionsfaktor *Signal Transducer und Aktivator der Transkription 1* (STAT 1). Nach Anbindung von IFN alpha an seine Rezeptoruntereinheiten IFNAR 1 und IFNAR 2 werden assoziierte Tyrosinkinasen aktiviert, welche zur Phosphorylierung von STAT 1 und STAT 2 führen. STAT1/2 Heterodimere translozieren dann in den Kern, binden an Promotoren verschiedener Zielgene und führen so zu ihrer Expression. Es werden eine Reihe antiviral wirkender Proteine wie MxA (Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein 78), OAS und PKR (Proteinkinase R) induziert, welche auf verschiedenen Ebenen die Virusreplikation inhibieren [121].

Im Schweinmodell konnte nachgewiesen werden, dass Gallesäuren direkt STAT 1 über einen cAMP und Proteinkinase A abhängigen Mechanismus hemmen [122]. Zusätzlich blockieren hydrophobe Gallesäuren die Jak1 (Janus activated kinase 1) - und Tyk2 (Tyrosinkinase 2) -Phosphorylierung und hemmen damit den STAT 1 Signalweg und Expression antiviraler Proteine [123].

Die Abbildung 5.1 zeigt die oben genannten möglichen Interaktion zwischen Gallensalzen und Virusreplikation bzw. antiviraler Mechanismen und der durch den Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP bedingten Veränderungen.

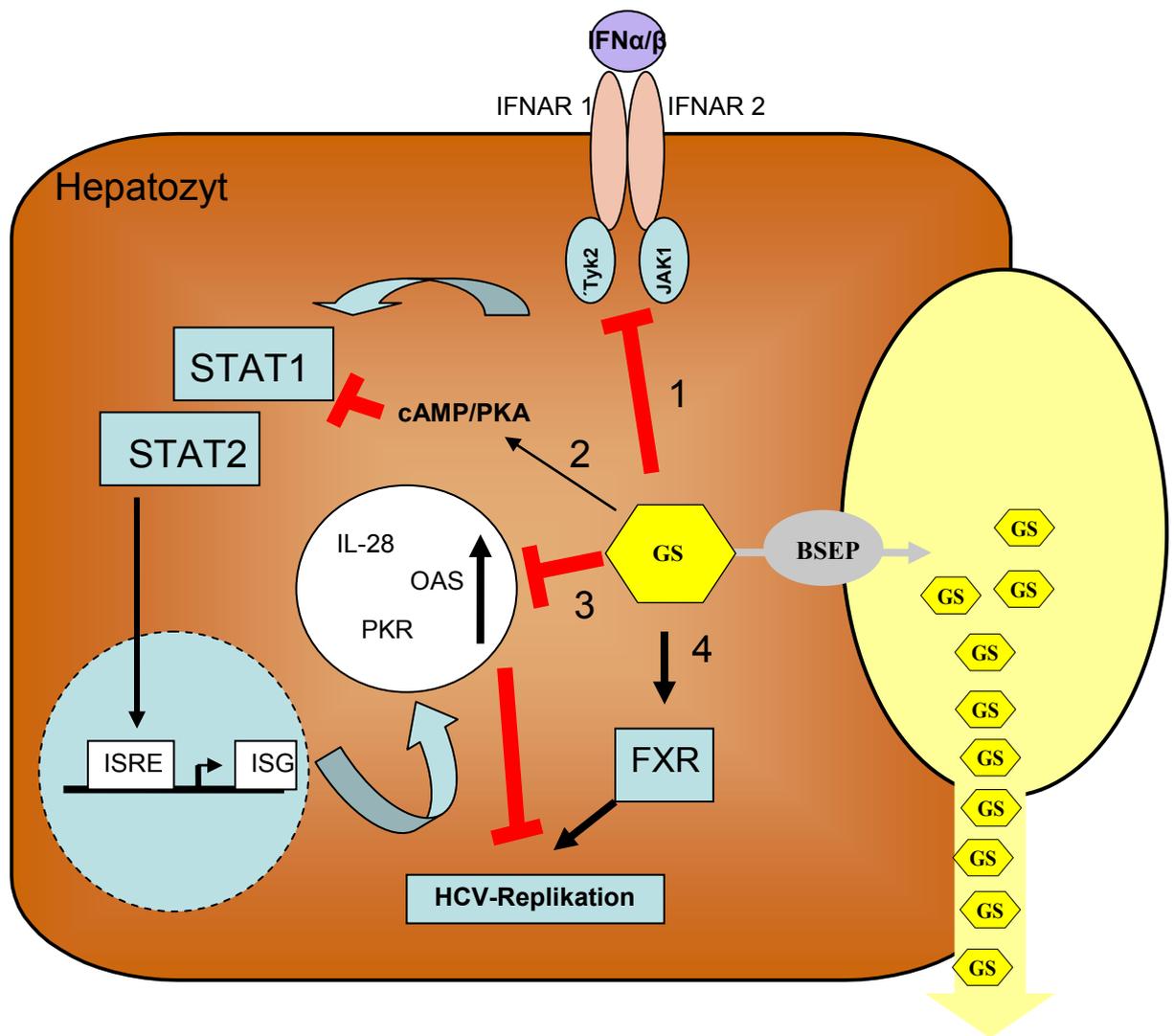


Abb. 5.1 Mögliche durch den Polymorphismus V444a der Gallensalzpumpe BSEP bedingte Interaktion und dadurch bedingte Veränderungen im Signalweg des Hepatozyten:

IFN (Interferon); JAK1 (Janus activated kinase 1); Tyk2 (Tyrosin kinase 2); STAT1/2 (signal transducer and activation of transcription 1/2); ISRE (Interferon Stimulated Response Element); ISG (Interferon Stimulated Genes); IL-28 (Interleukin 28); OAS (Oligoadenylatsynthetase); PKR (Protein Kinase R); cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat); PKA (Protein Kinase A); GS (Gallensäure); FXR (Farnesoid X Rezeptor). 1. Inhibierung der IFN α/β induzierten Immunantwort über Hemmung der Tyrosinkinase JAK1 und Tyk2. 2. Gallensäuren können direkt STAT 1 über einen cAMP und Proteinkinase A abhängigen Mechanismus. 3. Direkte Hemmung antiviraler Proteine wie IL28, OAS und PKR durch Gallensäuren. 4. Gallensäuren können zu einer Aktivierung von FXR führen und damit die HCV Replikation begünstigen.

5. Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis C Virus Infektion ist weltweit verbreitet. Die Therapieoptionen haben sich in den letzten 15 Jahren rasant entwickelt. Lagen die Therapieansprechquoten zu Beginn bei ca. 15%, so können mit der PEG-IFN-Kombinationstherapie Erfolgsraten bis 80% erzielt werden. Es konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, die mit einem Therapieansprechen assoziiert sind. Hierzu zählen Alter, Geschlecht, Infektionsdauer, Hepatitis C Viruslast, das Vorliegen einer Leberfibrose/-zirrhose und der HCV-Genotyp. Von diesen Faktoren ist der HCV-Genotyp der wichtigste. Neben diesen Faktoren wurden weitere wirtsspezifische Faktoren identifiziert, die ebenfalls mit einem Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden konnten, wie z. B. genetischer Polymorphismen, die im Bereich von Interleukin 28 auf Chromosom 19 liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP auf das Therapieansprechen bei therapienaiven Patienten mit einer chronischen HCV Infektion untersucht, die mit PEG-IFN in Kombination mit Ribavirin behandelt wurden. Es zeigte sich ein Einfluss des Polymorphismus auf das Therapieansprechen insbesondere bei Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert waren. Patienten mit dem Wildtyp für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP zeigten zum Ende der Therapie als auch am Ende der Nachbeobachtungszeit signifikant höhere Ansprechquoten (86,0% vs. 70,2%, $p=0,044$ bzw. 60,6% vs. 41,4%, $p=0,022$). In einer multivariaten Analyse konnte dieser Polymorphismus als unabhängiger prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung der Bedeutung dieses Polymorphismus auf molekularbiologischer Ebene besteht in der Hemmung der Immunantwort über die Akkumulation intrazellulärer Gallensäuren und damit verbundene Interferenz mit dem Interferonsignalweg. Eine Modifikation des IFN-alpha-Signalweges durch Gallensäuren ist bekannt, wobei eine Inhibition auf JAK1/STAT-Ebene diskutiert wird. Diese interferonantagonistische Wirkung von Gallensäuren könnte die molekulare Grundlage für das schlechtere Ansprechen bei Patienten mit einer chronischen HCV Infektion und dem nicht Vorliegen des V444A Wildtyps sein. Andererseits könnten erhöhte Gallensäurenspiegel direkt über den FXR, wie in vitro gezeigt, zur Induktion der HCV-Replikation führen.

6. Literatur

1. Heintges T, Wands JR: Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26(3): 521-6.
2. Duraisamy G, Zuridah H, Ariffin MY: Prevalence of hepatitis C virus antibodies in blood donors in Malaysia. *Med J Malaysia* 1993; 48(3): 313-6.
3. Irie Y, Hayashi H, Yokozeki K, Kashima T, Okuda K: Hepatitis C infection unrelated to blood transfusion in hemodialysis patients. *J Hepatol* 1994; 20(4): 557-9.
4. Suwanagool S, Tieangrim S, Ratanasuwan W, Mekanantagosol S, Luengrojanakul P, Kunasol P: Seroprevalence of anti-HCV among HIV-infected persons and general population. *J Med Assoc Thai* 1995; 78(11): 611-7.
5. Abdel-Aziz F, Habib M, Mohamed MK, et al.: Hepatitis C virus (HCV) infection in a community in the Nile Delta: population description and HCV prevalence. *Hepatology* 2000; 32(1): 111-5.
6. Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH: High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. Copenhagen Dialysis HCV Study Group. *J Infect Dis* 1993; 168(6): 1343-8.
7. Bjoro K, Froland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T: Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med* 1994; 331(24): 1607-11.
8. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS: The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31(3): 777-82.
9. Mele A, Tosti ME, Marzolini A, et al.: Prevention of hepatitis C in Italy: lessons from surveillance of type-specific acute viral hepatitis. SEIEVA collaborating Group. *J Viral Hepat* 2000; 7(1): 30-5.
10. Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M: Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ* 1999; 77(10): 801-7.
11. Jadoul M, Cornu C, van Ypersele de Strihou C: Incidence and risk factors for hepatitis C seroconversion in hemodialysis: a prospective study. The UCL Collaborative Group. *Kidney Int* 1993; 44(6): 1322-6.
12. Muller GY, Zabaleta ME, Arminio A, et al.: Risk factors for dialysis-associated hepatitis C in Venezuela. *Kidney Int* 1992; 41(4): 1055-8.

13. Cassidy MJ, Jankelson D, Becker M, Dunne T, Walzl G, Moosa MR: The prevalence of antibodies to hepatitis C virus at two haemodialysis units in South Africa. *S Afr Med J* 1995; 85(10): 996-8.
14. Gladziwa U, Schlipkoter U, Lorbeer B, Cholmakow K, Roggendorf M, Sieberth HG: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in patients on peritoneal dialysis--a multicenter study. *Clin Nephrol* 1993; 40(1): 46-52.
15. Schlipkoter U, Gladziwa U, Cholmakov K, et al.: Prevalence of hepatitis C virus infections in dialysis patients and their contacts using a second generation enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181(3): 173-80.
16. Stempel CA, Lake J, Kuo G, Vincenti F: Hepatitis C--its prevalence in end-stage renal failure patients and clinical course after kidney transplantation. *Transplantation* 1993; 55(2): 273-6.
17. Wasley A, Alter MJ: Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1): 1-16.
18. Nakashima K, Ikematsu H, Hayashi J, Kishihara Y, Mutsutake A, Kashiwagi S: Intrafamilial transmission of hepatitis-C virus among the population of an endemic area of Japan. *Jama* 1995; 274(18): 1459-61.
19. Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, et al.: Molecular analysis of intraspousal transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1995; 22(4): 431-9.
20. Gordon SC, Patel AH, Kulesza GW, Barnes RE, Silverman AL: Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1992; 87(12): 1849-51.
21. Meisel H, Reip A, Faltus B, et al.: Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 345(8959): 1209-11.
22. Goto M, Fujiyama S, Kawano S, et al.: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9(1): 13-8.
23. Oshita M, Hayashi N, Kasahara A, et al.: Prevalence of hepatitis C virus in family members of patients with hepatitis C. *J Med Virol* 1993; 41(3): 251-5.
24. Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM: Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1): 1306-8.
25. Hsu HH, Wright TL, Luba D, et al.: Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology* 1991; 14(5): 763-7.
26. Pratt CC, Paone D, Carter RJ, Layton MC: Hepatitis C screening and management practices: a survey of drug treatment and syringe exchange programs in New York City. *Am J Public Health* 2002; 92(8): 1254-6.

27. Sherlock S: Hepatitis C virus: a historical perspective. *Dig Dis Sci* 1996; 41(12 Suppl): 3S-5S.
28. Inoue K, Yoshida M: [Overview of hepatitis C virus from its discovery to now]. *Rinsho Byori* 2001; 49(8): 733-40.
29. Fahim FA, Esmat AY, Hassan GK, Abdel-Bary A: Biochemical changes in patients with combined chronic schistosomiasis and viral hepatitis C infections. *Dis Markers* 2000; 16(3-4): 111-8.
30. Chang CJ, Ko YC, Liu HW: Serum alanine aminotransferase levels in relation to hepatitis B and C virus infections among drug abusers in an area hyperendemic for hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2000; 45(10): 1949-52.
31. Gaster B, Larson A: Chronic hepatitis C: common questions, practical answers. *J Am Board Fam Pract* 2000; 13(5): 359-63.
32. Poynard T, Bedossa P, Opolon P: Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349(9055): 825-32.
33. Fong TL, Shindo M, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM: Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 1991; 88(3): 1058-60.
34. Telfer P, Sabin C, Devereux H, Scott F, Dusheiko G, Lee C: The progression of HCV-associated liver disease in a cohort of haemophilic patients. *Br J Haematol* 1994; 87(3): 555-61.
35. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL: Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332(22): 1463-6.
36. Yano M, Kumada H, Kage M, et al.: The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23(6): 1334-40.
37. Niederau C, Lange S, Heintges T, et al.: Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998; 28(6): 1687-95.
38. 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(6): 1338-43.
39. Di Bisceglie 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(6): 969-74.
40. 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(2): 110-5.

41. Mattsson L, Sonnerborg A, Weiland O: Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers. *Liver* 1993; 13(5): 274-8.
42. Erhardt A, Hauck K, Häussinger D. Eisen als Komorbiditätsfaktor der chronischen Hepatitis C. *Med Klin* 2003;98:685-691.
43. Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S, et al.: Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 32(1): 135-8.
44. Fong TL, Han SH, Tsai NC, et al.: A pilot randomized, controlled trial of the effect of iron depletion on long-term response to alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28(3): 369-74.
45. Fontana RJ, Israel J, LeClair P, et al.: Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 31(3): 730-6.
46. Tsai NC, Zuckerman E, Han SH, Goad K, Redeker AG, Fong TL: Effect of iron depletion on long-term response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C who previously did not respond to interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(10): 1831-4.
47. Van Thiel DH, Friedlander L, Molloy PJ, et al.: Retreatment of hepatitis C interferon non-responders with larger doses of interferon with and without phlebotomy. *Hepatogastroenterology* 1996; 43(12): 1557-61.
48. Tremolada F, Casarin C, Alberti A, et al.: Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol* 1992; 16(3): 273-81.
49. Kenny-Walsh E: Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340(16): 1228-33.
50. Lauer GM, Walker BD: Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345(1): 41-52.
51. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al.: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321(22): 1494-500.
52. Alter HJ: Discovery of the non-A, non-B hepatitis virus: the end of the beginning or the beginning of the end. *Transfus Med Rev* 1989; 3(2): 77-81.
53. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902): 359-62.

- 54.** Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, et al.: Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 9): 2299-306.
- 55.** Goeser T, Tox U, Muller HM, Arnold JC, Theilmann L: [Significance of genotypes in chronic hepatitis C virus infection and hepatitis C virus induced liver cirrhosis in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 1995; 120(31-32): 1070-3.
- 56.** Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al.: Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19(1): 13-8.
- 57.** Simmonds P: Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21(2): 570-83.
- 58.** Smith DB, Pathirana S, Davidson F, et al.: The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 2): 321-8.
- 59.** Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, et al.: Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology* 1997; 26(4): 1006-11.
- 60.** Marcellin P, Bernuau J, Martinot-Peignoux M, et al.: Prevalence of hepatitis C virus infection in asymptomatic anti-HIV1 negative pregnant women and their children. *Dig Dis Sci* 1993; 38(12): 2151-5.
- 61.** Schreier E, Roggendorf M, Driesel G, Hohne M, Viazov S: Genotypes of hepatitis C virus isolates from different parts of the world. *Arch Virol Suppl* 1996; 11: 185-93.
- 62.** Fried MW: Viral factors affecting the outcome of therapy for chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; 4 Suppl 1: S8-S13.
- 63.** Chevaliez S, Pawlotsky JM: Interferons and their use in persistent viral infections. *Handb Exp Pharmacol* 2009(189): 203-41.
- 64.** Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ: Signalling pathways leading to IFN-alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med* 2009; 265(1): 43-57.
- 65.** Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, et al.: Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001; 345(20): 1452-7.
- 66.** Boyer N, Marcellin P: Natural history of hepatitis C and the impact of anti-viral therapy. *Forum (Genova)* 2000; 10(1): 4-18.
- 67.** Bronowicki JP, Barraud H, Peyrin-Biroulet L: [Epidemiology and natural history of hepatitis C]. *Rev Prat* 2005; 55(6): 607-14.
- 68.** Fried MW, Hoofnagle JH: Therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1995; 15(1): 82-91.

- 69.** Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al.: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1493-9.
- 70.** McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al.: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1485-92.
- 71.** Lindsay KL, Treppe C, Heintges T, et al.: A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 34(2): 395-403.
- 72.** Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al.: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347(13): 975-82.
- 73.** Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al.: Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352(9138): 1426-32.
- 74.** Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, et al.: Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33(2): 433-8.
- 75.** Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, et al.: Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 2006; 44(1): 97-103.
- 76.** Berg T, von Wagner M, Nasser S, et al.: Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130(4): 1086-97.
- 77.** Freshwater DA, O'donnell K, Mutimer DJ. Inferior response of Asian vs. non-Asian hepatitis C genotype 3 infection to combination antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2008; 15:115-9
- 78.** Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U et al. Update der S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion, *Z Gastroenterol* 2010; 48: 289–351.
- 79.** Higgins, C. F.: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu .Rev.Cell Biol.* 1992; 8: 67-113.
- 80.** Müller, M. und Jansen, P. L.: Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am.J Physiol* 1997; 272(6 Pt 1): G1285-G1303.
- 81.** Kullak-Ublick, G., Beuers, U., und Paumgartner, G.: Hepatobiliary transport. *J Hepatol.* 2000; 32(suppl. 1): 3-18.

- 82.** Byrne, J. A., Strautnieks, S. S., Higgins, C. F., Linton, K. J., and Thompson, R. J.: Function of BSEP. Falk Symposium 129 - Bile Acids: From genomics to disease and therapy 2003; 99-103.
- 83.** Strautnieks, S. S., Bull, L. N., Knisely, A. S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., Kagalwalla, A. F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R. M., and Thompson, R. J.: A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat.Genet.* 1998; 20(3): 233-238.
- 84.** Faber, K. N., Mol, O., Plass, J. R. M., Heegsma, J., Geuken, M., Müller, M., and Jansen, P. L.: Effect of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2) mutations on functioning of the bile salt export pump. Falk Symposium 129 - Bile Acids: From genomics to disease and therapy 2003; 128-132.
- 85.** Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J.: Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; 1: 945-951.
- 86.** Taguchi, Y., Kino, K., Morishima, M., Komano, T., Kane, S. E., and Ueda, K.: Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry* 1997; 36: 8883-8889.
- 87.** Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F., and Meier, P. J.: The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol.Chem.* 1998; 273(16): 10046-10050.
- 88.** Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E. G., Kim, R. B., Lan, L. B., and Schuetz, J. D.: Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol.Pharmacol.* 2000; 57: 24-35.
- 89.** Torok, M., Gutmann, H., Fricker, G., and Drewe, J.: Sister of P-glycoprotein expression in different tissues. *Biochem.Pharmacol.* 1999; 57(7): 833-835.
- 90.** Stieger, B., O'Neill, B., and Meier, P. J.: ATP-dependent bile salt transport in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *Biochem J* 1992; 284: 67-84.
- 91.** Noé, J., Stieger, B., and Meier, P. J.: Functional expression of the canalicular bile salt export pump (BSEP) of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1659-1666.
- 92.** Kullak-Ublick, G., Stieger, B., Hagenbuch, B., and Meier, P. J.: Hepatic transport of bile acids. *Semin.Liver Dis.* 2000; 20: 273-292.
- 93.** Meier, P. J. und Stieger, B.: Bile salt transporters. *Annu.Rev.Physiol* 2002; 64: 635-661.

- 94.** Lecureur, V., Courtois, A., Payen, L., Verhnet, L., Guillouzo, A., und Fardel, O.: Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. *Toxicology* 2000; 153: 203-219.
- 95.** Häussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., und Gerok, W.: Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem.J.* 1993; 291 (Pt 2): 355-360.
- 96.** Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerová D, Rayner A, Dutton L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology.* 2008;134:1203-14.
- 97.** Knisely, A. S.: Progressive familial intrahepatic cholestasis: a personal perspective. *Pediatric and Developmental Pathology* 2000; 3: 113-125.
- 98.** Jansen, P. L., Hooiveld, G. J., Jacquemin, E., Sokal, E., Van Goor, H., und Koning, J.: The canalicular bile salt exporting protein BSEP is not expressed in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Hepatology* 1998; 28: 498A.
- 99.** Whittington, P. F., Freese, D. K., Alonso, E. M., Schwarzenberg, S. J., und Sharp, H. L.: Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J.Pediatric Gastroenterol.Nutr.* 1994; 18: 134-141.
- 100.** Strautnieks, S. S. und et al.: Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 61: 630-633.
- 101.** Thompson, R. J. und Strautnieks, S. S.: The role of the bile salt export pump BSEP in genetic cholestasis. *Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application* 1997; 115-122.
- 102.** Wang, L., Soroka, C., und Boyer, J. L.: The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002; 110: 965-972.
- 103.** Keitel, V., Brudelski, M., Warskulat, U., Kuhlkamp, T., Keppler, D., Häussinger, D., und Kubitz, R.: Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 2005; 41(5): 1160-1172.
- 104.** Müller, M., Hooiveld, G. J., Mol, O., Koning, H., Gouw, A., Kuipers, F., Van Goor, H., and Jansen, P. L.: The canalicular bile salt export pump BSEP is not expressed in livers of PFIC-2 patients. *Falk Symposium 93 - Bile acids in hepatobiliary diseases: basic research and clinical application* 1996; 220-223.
- 105.** Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G., und Meier, P. J.: Drug- and estrogeninduced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118: 422-430.

- 106.** Moseley, R. H., Wang, W., Takeda, H., Lown, K., Shick, L., Ananthanarayanan, M., und Suchy, F. J.: Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver: a potential model for sepsis-associated cholestasis. *Am.J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1): G137-G146.
- 107.** Bossard, R., Stieger, B., O'Neill, B., Fricker, G., und Meier, P. J.: Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest* 1993; 91: 2714-2720.
- 108.** Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G., und Meier, P. J.: Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118: 422-430.
- 109.** Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., Ferenci, P., Stauber, R. E., Krejs, G. J., Denk, H., Zatloukal, K., und Trauner, M.: Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001; 33(3): 633-646.
- 110.** Lammert, F., Beier, D. R., Wang, D. Q. H., und Carey, M. C.: Genetic mapping establishes Sister-P-glycoprotein (Spgp) as candidate for the major gallstone gene (Lith1). *Hepatology* 1997; 26: 358A.
- 111.** Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology* 1999;29:1840-1847.
- 112.** Reinehr R, Graf D, Häussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 2003;125:839-853.
- 113.** Jorquera F, Monte MJ, Guerra J, Sanchez-Campos S, Merayo JA, Olcoz JL, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic markers to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:547-554.
- 114.** Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, Nussler N, Eichelbaum M, Meier PJ, Stieger B. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006;44:62-74.
- 115.** Chang KO, George DW. Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *J Virol* 2007;81:9633-9640.
- 116.** Scholtes C, Diaz O, Icard V, Kaul A, Bartenschlager R, Lotteau V, Andre P. Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR. *J Hepatol* 2008;48:192-199.
- 117.** Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Pauli-Magnus C. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the

multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17:47-60.

118. Iwata R, Stieger B, Mertens JC, Muller T, Baur K, Frei P, Braun J, Vergopoulos A, Martin IV, Schmitt J, Goetze O, Bibert S, Bochud PY, Mullhaupt B, Berg T, Geier A. The role of bile acid retention and a common polymorphism in the ABCB11 gene as host factors affecting antiviral treatment response in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2010.

119. Podevin P, Calmus Y, Bonnefils MT, Veyrunes C, Chereau C, Poupon R. Effect of cholestasis and bile acids on interferon-induced 2',5'-adenylate synthetase and NK cell activities. *Gastroenterology* 1995;108:1192-1198.

120. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-264.

121. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:2619-27.

122. Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Kim Y, Saif LJ, Green KY. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8733-8738.

123. Graf D, Haselow K, Munks I, Bode JG, Häussinger D. Inhibition of interferon-alpha-induced signaling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids. *Biol Chem* 2010;391:1175-1187.

7. Abkürzungsverzeichnis

APRI	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/Thrombozyten-Ratio-Index
AST	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSEP	Bile Salt Export Pump
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DNA	deoxyribonucleic acid
ETR	end of treatment response
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GC	Glykocholat
GGT	γ -Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HIV	Humanen Immundefizienz-Virus
i. v.	intravenös
IE	internationale Einheit
IFN	Interferon
IL 28B	Interleukin 28B
Jak	Janus activated kinase
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
MW	Mittelwert
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OR	odds ratio
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG-IFN	pegyliertes Interferon
PGP	P-Glykoprotein
PKR	Proteinkinase R

RNA	ribonucleic acid
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STD	Standardabweichung
SVR	sustained virological response
Tab.	Tabelle
TC	Taurocholat
TCDC	Taurochenodeoxycholat
TUDC	Tauroursodeoxycholat
Tyk	Tyrosinkinase
V444A	Austausch des Valin an Position 444 durch Alanin

8. Lebenslauf

Personalien

Nachname: Sagir
Geburtsname: Canpolat
Name: Nebahat
Geburtsdatum: 31.07.78
Geburtsort: Wissen
Adresse: Wäschlacker Weg 12, 40231 Düsseldorf

Studium

10/03 Studium der Zahnmedizin in Düsseldorf
0/04 Zahnärztliche Vorprüfung
03/06 Physikum
05/10 Zahnärztliche Prüfung

Zahnärztliche Tätigkeit

09/10 – 08/12 Assistentin in der Zahnarztpraxis S. Yilmaz in Düsseldorf

Düsseldorf, den 26.02.2013 N. Sagir

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir während der Arbeit an der vorliegenden Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Insbesondere danke ich:

- Herrn Professor Dr. D. Häussinger für die Möglichkeit an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Hepatologie die Arbeit an zu fertigen.
- Herrn Professor Dr. R. Kubitz für die Überlassung des Themas, sehr gute Betreuung, ständige Motivation und vielfältigen Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinem Ehemann und meiner Tochter, die mich in allen Situationen unterstützt und gefördert haben.

Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzpumpe BSEP auf das Therapieansprechen bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virus Infektion

Nebahat Sagir

Die chronische Hepatitis C Virus Infektion ist weltweit verbreitet. Die Therapieoptionen haben sich in den letzten 15 Jahren rasant entwickelt. Es konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, die mit einem Therapieansprechen assoziiert sind. Hierzu zählen Alter, Geschlecht, Infektionsdauer, Hepatitis C Viruslast, das Vorliegen einer Leberfibrose/-zirrhose und der HCV-Genotyp. Neben diesen Faktoren wurden weitere wirtsspezifische Faktoren identifiziert, die ebenfalls mit einem Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden konnten, wie z. B. genetischer Polymorphismen, die im Bereich von Interleukin 28 auf Chromosom 19 liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP auf das Therapieansprechen bei therapienaiven Patienten mit einer chronischen HCV Infektion untersucht, die mit PEG-IFN in Kombination mit Ribavirin behandelt wurden. Es zeigte sich ein Einfluss des Polymorphismus auf das Therapieansprechen insbesondere bei Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert waren. Patienten mit dem Wildtyp für den Polymorphismus V444A der Gallensalzexportpumpe BSEP zeigten zum Ende der Therapie als auch am Ende der Nachbeobachtungszeit signifikant höhere Ansprechquoten (86,0% vs. 70,2%, $p=0,044$ bzw. 60,6% vs. 41,4%, $p=0,022$). In einer multivariaten Analyse konnte dieser Polymorphismus als unabhängiger prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung der Bedeutung dieses Polymorphismus auf molekularbiologischer Ebene besteht in der Hemmung der Immunantwort über die Akkumulation intrazellulärer Gallensäuren und damit verbundene Interferenz mit dem Interferonsignalweg. Eine Modifikation des IFN-alpha-Signalweges durch Gallensäuren ist bekannt, wobei eine Inhibition auf JAK1/STAT-Ebene diskutiert wird. Diese interferonantagonistische Wirkung von Gallensäuren könnte molekulare Grundlage für das schlechtere Ansprechen bei Patienten mit einer chronischen HCV Infektion und nicht Vorliegen des V444A Wildtyps sein. Andererseits könnten erhöhte Gallensäurenspiegel direkt über den FXR, wie in vitro gezeigt, zur Induktion der HCV-Replikation führen.

Professor Dr. R. Kubitz

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist

Nebahat Sagir