

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

**Der V444A-Polymorphismus der Gallensalzexportpumpe BSEP ist
ein Prädiktor für das Therapieansprechen bei Patienten mit einer
chronischen Hepatitis C-Virusinfektion**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christoph Hermann Brinkmeyer

2014

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

gez.

Dekan	Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent	Univ.-Prof. Dr. med. Ralf Kubitz
Korreferent	Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Für Sophia

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kubitz Ralf, Brinkmeyer Christoph, Sagir Abdurrahman, Herebian Diran, Häussinger Dieter – Genetic variants of the bile salt export pump: inducers and modifiers of liver diseases. DIGESTIVE DISEASES (2011); 29: 89-92.

Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus stellt eine wichtige Ursache für die Entstehung der Leberzirrhose und den damit verbundenen Komplikationen dar. Die therapeutischen Optionen sind begrenzt, die bisherige Standardtherapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin führt bei dem am häufigsten vorkommendem Genotyp 1 nur in circa 45-50% der Fälle zu einer dauerhaften Viruselimination.

In unserer Studie wurden zwei unabhängige Genvarianten auf ihren Einfluss im Rahmen der antiviralen Therapie mit pegyliertem Interferon- α in Kombination mit Ribavirin über eine Dauer von 24 beziehungsweise 48 Wochen bei insgesamt 352 Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv mit einem Chi-Quadrat-Wert von 5,735 und einem zugehörigen p-Wert $<0,05$ ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem V444A-Polymorphismus der Gallensalzpumpe BSEP (rs2287622) und einem dauerhaften Therapieansprechen besteht. Hierbei erhöht eine Homozygotie für das T-Allel des V444A-Polymorphismus im Vergleich zu einer Homo- oder Heterozygotie für das C-Allel die Wahrscheinlichkeit für ein primäres Therapieansprechen (ETR) um den Faktor 2,634 (*Odds Ratio*), und die einer dauerhaften Viruselimination (SVR) um den Faktor 2,613. Ebenfalls konnten wir mit Chi-Quadrat-Werten von 30,960 für eine ETR und 24,011 für eine SVR, jeweils mit einem p-Wert $<0,01$, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IL28B-Polymorphismus rs8099917 und einem primären beziehungsweise dauerhaften Therapieansprechen nachweisen. Bei einer Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus erhöht sich statistisch die Wahrscheinlichkeit einer ETR um den Faktor 4,093 und die einer SVR um den Faktor 3,101.

Für den Zusammenhang zwischen dem T-Allel des V444A-Polymorphismus und einer Therapie*response* bei einer gleichzeitigen Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus lassen sich Chi-Quadrat-Werte von 4,001 für eine ETR und von 4,425 für eine SVR mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ berechnen. Demnach können wir einen additiven Effekt einer Homozygotie des T-Allels des V444A-Polymorphismus und des T-Allels des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Erreichens einer ETR und einer SVR nachweisen.

Da der V444A-Polymorphismus über eine verminderte BSEP-Expression zu einer erhöhten hepatozellulären Gallensalzkonzentration führen kann, wird in dieser Arbeit als Erklärung dieser Ergebnisse eine Interaktion der Gallensalze mit der Interferon- Signal-Kaskade diskutiert, sowie eine Gallensalz-induzierte Steigerung der HCV- Replikation.

Durch die zunehmende Kenntnis genetischer Polymorphismen mit Einfluss auf das Therapie-*Outcome* wird eine differenziertere Indikationsstellung zur Therapie für jeden Patienten ermöglicht, weiterhin könnte durch eine medikamentöse Senkung der hepatozellulären Gallensalzkonzentration auch bei Patienten mit ungünstigen genetischen Voraussetzungen ein besseres Therapieansprechen erreicht werden.

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette-Transporter
BRIC	Benigne rekurrente intrahepatische Cholestase
BSEP	bile salt export pump
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodesoxycholsäure
DIC	<i>Drug induced cholestasis</i>
DF	Freiheitsgrad
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
eIF-2	eukaryontischer Initiationsfaktor-2
ETR	<i>End of Treatment Response</i>
FRET	Floureszenzresonanzenergietransfer
FXR	Farnesoid X Rezeptor
gamma-GT	gamma-Glutamyl-Transferase
GC	Glycocholat
GCDC	Glycochenodeoxycholat
GGs	Guggulsterone
GPT	Glutamat Pyruvat Transferase
GOT	Glutamat Oxalat Transferase
GS	Gallensalze
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
ICP	<i>intrahepatic cholestasis of pregnancy</i>
IFI44	<i>interferon-induced protein 44</i>
IFIT1	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β Rezeptor
IFNLR1	Interferon-lambda-Rezeptor1

IL-28B	Interleukin-28B
IL-10R2	IL-10-Rezeptor2-Untereinheit
IL-28R1	Interleukin-28Rezeptor1-Untereinheit
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISDR	<i>interferon sensitivity determining region</i>
ISG	interferon-stimulated gene
ISGF	<i>interferon-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-abhängige Proteinkinase
MDA-5	<i>Melanoma-differentiation-associated gene-5</i>
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
MGB	Minor Groove Binder
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
NBF	<i>nucleotide-binding fold</i>
NF-κB	<i>factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFQ	Nicht-floureszierender Quencher
NTCP	Na ⁺ -taurocholat cotransporting protein
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
OCT	<i>organic cation transporter</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEC	porcines enterisches Calicivirus
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIAS	<i>protein Inhibitor of activated STAT</i>
PFIC-2	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PP2A	Protein Phosphatase 2A

RIG-I	<i>retinoic acid inducible protein-1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid X Rezeptor
SNP	<i>single-nucleotide-polymorphism</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SP	Signal-Peptidase
SPP	Signal-Peptid-Peptidase
ssRNA	Einzelsträngige RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVR	<i>sustained virological response</i>
TC	Taurocholat
TCDC	Taurochenodeoxycholat
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TUDC	Tauroursodeoxycholat
TYK	Tyrosinkinase
UDC	Ursodesoxycholsäure
UTR	<i>untranslated region</i>
ZnCl ₂	Zinkchlorid

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Hepatitis C	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Symptome und klinischer Verlauf	1
1.1.3 Molekulare Struktur des Hepatitis C-Virus und Virusreplikation	2
1.1.4 Diagnose und Therapie	7
1.2 Interferone	9
1.2.1 Typ I-Interferone und Signaling	9
1.2.2 Antivirale Proteine	12
1.2.3 Proteinkinase R (PKR)	12
1.2.4 Mx-Proteine	13
1.2.5 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2'-5'-OAS) und RNase L	14
1.3 Gallensalze	14
1.3.1 Hepatozyten	14
1.3.2 Hepatobiliärer Transport	15
1.4 Bile Salt Export Pump (BSEP)	19
1.4.1 Struktur	19
1.4.2 Funktion	20
1.4.3 Regulation	21
1.4.4 V444A-Polymorphismus	24
1.5 Interleukin-28	25
1.5.1 Interleukin-28-Polymorphismus bei der Therapie der chronische Hepatitis C-Virusinfektion	28
2. Fragestellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material- und Geräteliste	30
3.2 Ethikvotum	32
3.3 Isolation der DNA	32
3.4 Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion und Schmelzkurvenanalyse	32
3.5 Sequenzierung	36
3.6 TaqMan® SNP Genotyping Assay	39

3.7	Statistische Methoden	43
4.	Ergebnisse und Auswertung der statistischen Ergebnisse	45
4.1	V444A-Polymorphismus	45
4.1.2	<i>Statistische Auswertung der Messungen</i>	46
4.1.2.1	<i>Parametrische Tests</i>	46
4.1.2.2	<i>Nichtparametrische Tests, Rangsummentests</i>	49
4.1.2.3	<i>Zusammenhangtests</i>	52
4.1.2.4	<i>Modellgütetests</i>	57
4.2	Interleukin-28B	64
4.2.1	<i>Zusammenhangstests</i>	65
4.2.2	<i>Logistische Regression</i>	71
4.2.3	<i>Logistische Regression, das Cox – Modell</i>	73
5.	Diskussion	78
5.1	Gallensalze beeinflussen das Interferonsignaling	79
5.2	Gallensalze beeinflussen die Virusreplikation	84
5.3	Der IL28-B-Polymorphismus als Einflussfaktor für den Therapieerfolg	86
6.	Schlussfolgerung	91
7.	Quellenverzeichnis	93
8.	Eidesstattliche Versicherung	106
9.	Danksagung	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Das Polyprotein des Hepatitis C-Virus	4
Abbildung 2	Übersicht Interferon-Signaling	11
Abbildung 3	Übersicht über die hepatozellulären Transportproteine	17
Abbildung 4	Molekulare Struktur der Bile salt export pump BSEP	20
Abbildung 5	Typ-III-Interferon-Signaling	27
Abbildung 6	Sequenzen des für die Real-Time-PCR verwendeten Primerpaares	33
Abbildung 7	Real-Time PCR und Schmelzkurvenanalyse	34
Abbildung 8	Graphische Darstellung der Schmelzkurvenanalysen	35
Abbildung 9	Polymerase-Ketten-Reaktion zur Sequenzierung der DNA	37
Abbildung 10	Basen-Sequenz bei Homozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel	38
Abbildung 11	Basen-Sequenz bei Heterozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel bzw. den Polymorphismus	38
Abbildung 12	Basen-Sequenz bei Homozygotie für den V444A-Polymorphismus	39
Abbildung 13	Protokoll der Real-Time-PCR und Fluoreszenzanalyse für den TaqMan Assay	41
Abbildung 14	Graphische Darstellung der Fluoreszenzanalysen	42
Abbildung 15	Einfluss der Gallensalze auf das Interferon-Signaling und die Virusreplikation	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Patientenkollektiv, Mittelwerte	47
Tabelle 2	Levene-Test der Varianzgleichheit	47
Tabelle 3	T-Test der Mittelwertgleichheit	48
Tabelle 4	Rangsummentest	50
Tabelle 5	Mann-Whitney-U-Test	51
Tabelle 6	Verarbeitete Fälle für Zusammenhangstests	52
Tabelle 7	Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich Geschlecht, HCV-Genotyp und Interferontherapie	54
Tabelle 8	Chi-Quadrat-Test nach Pearson - Korrelation des V444A-Polymorphismus mit Geschlecht, HCV-Genotyp und Interferontherapie	54
Tabelle 9	Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens	55
Tabelle 10	Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des V444A-Polymorphismus mit dem Therapieansprechen	56
Tabelle 11	Verarbeitete Fälle für Modellgütetests	58
Tabelle 12	Nullmodell“, Likelihood-Quotiententest	59
Tabelle 13	Güte des Modells, Pseudo-R ² -Koeffizient	60
Tabelle 14	Prädiktorenmodell, Likelihood-Quotiententest	61
Tabelle 15	Parameterschätzung, Wald-Statistik	62
Tabelle 16	Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens	65
Tabelle 17	Chi-Quadrat-Test nach Pearson - Korrelation des IL28B-Polymorphismus mit dem Therapieansprechen	66
Tabelle 18	Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens	67
Tabelle 19	Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens	68
Tabelle 20	Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens	68
Tabelle 21	Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des IL28B-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens	69
Tabelle 22	Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 und Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens	70
Tabelle 23	Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des IL28B-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens	70

Tabelle 24	Logistische Regression für ETR	72
Tabelle 25	Logistische Regression für SVR	72
Tabelle 26	Cox-Modell für ETR in Abhängigkeit vom V444A-Polymorphismus	73
Tabelle 27	Cox-Modell für SVR in Abhängigkeit vom V444A-Polymorphismus	74
Tabelle 28	Cox-Modell für ETR in Abhängigkeit vom IL28B-Polymorphismus	75
Tabelle 29	Cox-Modell für SVR in Abhängigkeit vom IL28B-Polymorphismus	76

1. Einleitung

1.1. Hepatitis C

1.1.1 Epidemiologie

Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus und die damit verbundenen Komplikationen stellen ein globales Problem dar. Nach Datenlage der Weltgesundheitsorganisation WHO (*World Health Organisation*) und des *European Center for Disease Prevention and Control* sind weltweit bis zu 130 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert. 170 Millionen Menschen hatten Kontakt mit dem Virus, das entspricht einem Anteil von 2-3% der Weltbevölkerung [01]. In der deutschen Bevölkerung beträgt die Seroprävalenz von Anti-HCV-Antikörpern 0,4%. Unter der Annahme, dass 60-80% der HCV-Infektionen chronisch verlaufen, sind 400.000 bis 500.000 Menschen in Deutschland Virusträger [02].

Es existieren die sieben verschiedenen Genotypen 1 bis 7 des Hepatitis C-Virus, sowie multiple Subtypen [03], wobei die Verbreitung der verschiedenen Genotypen und Subtypen geographische Unterschiede aufweist [04]. Die Genotypen 1a und 1b sind die Häufigsten in Europa und den Vereinigten Staaten. In Deutschland ist der Subtyp 1b am weitesten verbreitet, gefolgt von Genotyp 2 und 3. Die Diagnose der übrigen Subtypen ist dort seltener [05].

1.1.2 Symptome und klinischer Verlauf

Eine Übertragung des Virus erfolgt durch Kontakt mit Blut oder Blutprodukten, die Virus-RNA enthalten, ist aber auch durch eine parenterale Exposition möglich [06]. Die akute Infektion verläuft meist inapparent, lediglich in einem Drittel aller Fälle

treten während einer akuten HCV-Infektion Symptome wie Ikterus auf [04]. Ein fulminanter Verlauf mit akutem Leberversagen tritt selten auf [07].

Eine chronische HCV-Infektion ist definiert als eine länger als sechs Monate fortbestehende Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV-RNA positiv) [04]. Diese führt zu einer laborchemischen und / oder histologisch nachweisbaren Leberschädigung unterschiedlichen Ausmaßes. In der überwiegenden Zahl der Fälle kommt es zu einer chronischen Hepatitis, die langsam progredient ist [05]. Die Hepatitis entsteht durch eine Reaktion des Immunsystems auf Virusantigene, welche zwar einen Leberzellschaden mit konsekutiver Leberfibrose verursacht, eine Elimination des Virus jedoch nicht erreicht [08]. Leberzirrhose, hepatische Dekompensation und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellen relevante krankheitsassoziierte Komplikationen dar und können im natürlichen Verlauf der Infektion auf die chronische Leberentzündung zurückgeführt werden. Einer Statistik aus dem Jahr 2000 zufolge werden weltweit 27% aller Leberzirrhose-Fälle und 25% aller HCC-Fälle durch eine chronische HCV-Infektion verursacht [09]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer extrahepatischen Manifestation einer HCV-Infektion, die sich in Form von rheumatischen Beschwerden wie Arthralgien, Myalgien und Parästhesien sowie kutanen Symptomen wie Pruritus, Sicca-Symptomatik oder einem Raynaud-Syndrom darstellt [08]. Eine Minderung der Lebensqualität, sowie eine signifikante Erhöhung des leberbezogenen Mortalitätsrisikos sind die Folgen [10; 11].

1.1.3 Molekulare Struktur des Hepatitis C-Virus und Virusreplikation

Das Hepatitis C-Virus ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus, das zu den Flaviviren gezählt wird. Die Erstbeschreibung erfolgt 1989 von Choo et al. [12]. Natürliche Zielzellen stellen Hepatozyten und möglicherweise auch B-Lymphozyten dar [05]. Nach der Fusion der Virushülle mit der Membran der Wirtszelle kommt es zur Freisetzung des Virusgenoms, einer Einzelstrang-RNA mit positiver Polarität und einer Größe von ungefähr 9.6 Kilobasen, in das Zytoplasma [05; 13]. Dort findet die

anschließende Replikation des Hepatitis C-Virusgenoms statt, diese ist an intrazelluläre Membranstrukturen wie das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und Lysosomen gebunden. Initial kommt es zur Synthese mehrerer negativ-RNA-Stränge, die wiederum als Vorlage für neue plus-Strang RNAs dienen und zum Nukleokapsid polymerisiert werden oder in das virale Polyprotein translatiert werden [05]. Das Virusgenom kodiert für einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), welcher von nicht-kodierenden Regionen (*untranslated regions*, UTR) am 3'- und 5'-terminalen Ende flankiert wird. Diese nicht-kodierenden Regionen haben sowohl regulatorische Funktion auf die Virusreplikation, als auch eine essentielle Bedeutung für die Infektiosität des Virus [06].

Das Polyprotein, welches von dem Genom innerhalb des offenen Leserahmens kodiert wird, hat eine Größe von 3008 bis 3037 Aminosäuren, in Abhängigkeit vom Genotyp (Abbildung 1). Durch luminal im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte, zelluläre wirtseigene Proteasen und zwei virale Proteasen wird es im Rahmen der ko- und posttranslationalen Prozessierung in verschiedene strukturelle und nicht-strukturelle Proteine gespalten [14; 15]. Die wirtskodierten Enzyme **Signal-Peptidase (SP)** und **Signal-Peptid-Peptidase (SPP)** spalten im Rahmen der Virusreplikation das Polyprotein an den für Strukturproteine kodierenden Stellen **C/E1**, **E1/E2**, **E2/p7** und **p7/NS2**. Der Bereich des Polyproteins, welcher die Nicht-Struktur-Proteine beinhaltet, wird von den beiden viruseigenen Proteasen **NS2** und **NS3** gespalten [05]. Zu den strukturellen Proteinen gehören das **Core-Protein** und die Glycoproteine **E1** und **E2**, zu den nicht-strukturellen Proteinen werden **NS2**, **NS3**, **NS4A**, **NS4B**, **NS5A** und **NS5B** gezählt. Das hydrophobe Protein **p7** mit einer Größe von 67 Aminosäuren bildet die Verbindung zwischen den strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen. Die genaue Funktion dieses Proteins ist bislang unklar [16], es wird jedoch angenommen, dass das Protein als Hexamer die Ionenpermeabilität von Membranen beeinflusst und damit Einfluss auf die Freisetzung von Viruspartikeln aus der Wirtszelle nimmt [14].

Zwischen dem **Core-Protein** und dem **E1-Protein** liegt eine spezifische Signalsequenz, die für das *Targeting* des Polyproteins an das Endoplasmatische Retikulum der Wirtszelle verantwortlich ist [17]. Hier kommt es durch Signal-Peptidase SP zuerst zu einer Spaltung dieser Signalsequenz. Durch eine integrale

Membran-Peptidase SPP findet anschließend eine Prozessierung des *Core*-Proteins statt, die zur Ablösung des *Core*-Proteins vom Endoplasmatischen Retikulum führt.

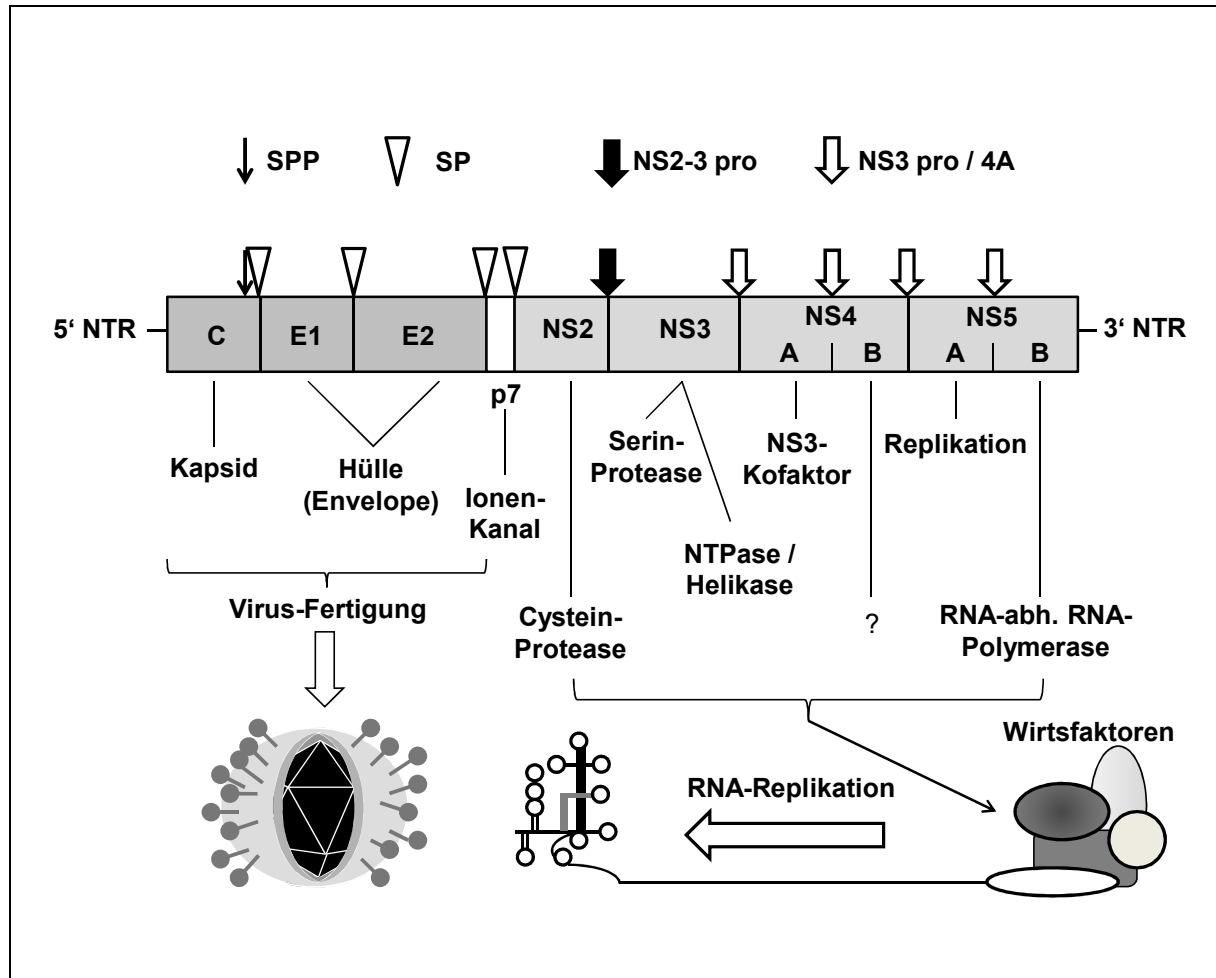


Abb. 1: **Das Polyprotein des Hepatitis C-Virus.** Das Polyprotein wird durch wirtseigene und virale Proteasen im Rahmen der ko- und posttranslationalen Prozessierung in strukturelle und nicht-strukturelle Proteine gespalten (modifiziert nach [15]). NS2 = NS2-3 pro = NS2-NS3 Protease; NS3 pro / 4A = NS3 Protease / NS4A-Komplex; SP = Signalpeptidase; SPP = Signalpeptid-Peptidase.

Durch diese Prozessierung entstehen verschiedene Formen des Proteins, welche aufgrund ihrer Lokalisation im Zytoplasma oder im Zellkern modulierenden Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Vorgänge wie Gentranskription, Zell-Differenzierung, Apoptose, diverse intrazelluläre Signalwege, Karzinogenese und den Lipid-Stoffwechsel nehmen [14; 16]. Darüber hinaus kommt dem Protein eine essentielle Bedeutung als Baustein des viralen Nukleokapsids zu. Durch Bindung von

genomischer HCV-RNA und Polymerisation führt es so zur Bildung neuer Viruspartikel [13].

Die Glycoproteine **E1** und **E2** sind transmembrane Hüllproteine, die als Strukturproteine die Virushülle (*envelope*) bilden. Innerhalb von Membranen liegen die Proteine E1 und E2 als nicht-kovalent verbundene Heterodimere vor [14]. Neben ihrer Funktion zur Bildung von Viruspartikeln spielen sie eine essentielle Rolle beim Eindringen des Virus in die Zielzelle. Nach Interaktion mit dem CD81-Rezeptor der Zielzelle induzieren sie die Fusion von Virushülle und Zellmembran und ermöglichen damit eine Freisetzung des Virusgenoms ins Zellinnere [18]. Auf diese Weise tragen die Proteine E1 und E2 wesentlich zur Erkennung der Wirtszelle und der Infektiosität des Virus bei [14].

Das nicht-strukturelle Protein **NS2** ist ein nichtglykosyliertes integrales Membranprotein mit einer Größe von 23kDa, welches jedoch für die Formation neuer Viruspartikel keine Bedeutung zu haben scheint. Die Spaltung von p7/NS2 wird durch die Signal-Peptidase SP der Wirtszelle vermittelt, während die Spaltung von NS2/NS3 autokatalytisch durch NS2 selbst und die Serin-Protease-Domäne von NS3 geschieht [13]. Für diese Funktion ist der NS2-/NS3-Komplex auf die Anwesenheit von $ZnCl_2$ angewiesen, eine Chelierung von Zink durch EDTA führt zur Hemmung der Spaltung [14].

NS3 ist ein 70kDa großes multifunktionales Protein, welches Aufgaben im Rahmen der Virusreplikation als auch der Polyproteinprozessierung erfüllt. N-Terminal weist NS3 eine Serinprotease-Domäne auf, die eine Autoprotease-Funktion im Komplex mit NS2 zeigt. Für die intramolekulare Spaltung an den Bindungsstellen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B ist die Protease auf die Anwesenheit von NS4A als stabilisierendem Ko-Faktor angewiesen [15]. Da durch eine Inhibition der NS3-Protease-Aktivität eine Prozessierung des Polyproteins und damit eine Virusreplikation verhindert werden kann, ist dieses Enzym ein neuer Angriffspunkt antiviraler Medikamente (Protease-Inhibitoren). C-Terminal zeigt NS3 eine NTPase-/Helikase-Domäne, welche zur Helikase-Superfamilie II gezählt wird [14]. Die Helikase wird für die RNA-Replikation benötigt, da sie in der Lage ist, die RNA-Matrize bzw. neusynthetisierte dsRNA aber auch dsDNA und RNA-/DNA-Hybride in

3'-5'-Richtung zu entwinden [13; 15]. Die dazu benötigte Energie wird durch hydrolytische Spaltung von Nukleosidtriphosphaten erzeugt [13]. Zusammen mit Protein NS5B stellt NS3 daher den sogenannten Replikase-Komplex dar [05].

Während dem 8 kDa großen Protein **NS4A** als Kofaktor der Serinprotease-Domäne von NS3 eine essentielle Rolle als Stabilisator und Katalysator im Replikationszyklus zukommt, ist die Funktion des Proteins **NS4B** unbekannt [05; 19].

NS5A ist ein Protein mit einer Größe von 56 kDa, dessen genaue Funktion im Replikationszyklus nicht bekannt ist, jedoch eine Rolle bei der Interferon-Resistenz des Virus zu spielen scheint [19]. Besonderes Interesse an NS5A löste die Identifizierung eines Sequenzabschnittes aus, der zwischen den Aminosäuren 2009 und 2048 innerhalb des Proteins liegt und als „*interferon sensitivity-determining region*“ (ISDR) bezeichnet wird [14; 19]. Virus-Isolate aus chronisch infizierten HCV-Patienten, die nach einer Interferon-Therapie eine Viruselimination zeigten, wiesen im Vergleich zu Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprachen, signifikante Unterschiede innerhalb dieser Aminosäuresequenz auf. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Interaktion von NS5A mit einem interferon-induzierbaren Protein, der Proteinkinase R (PKR) angenommen. Durch einen Interferonstimulus kommt es in virusinfizierten Zellen zur Bildung antiviraler Proteine, unter anderem der Proteinkinase R. In aktiviertem Zustand bewirkt die PKR die Phosphorylierung des Translationsfaktors „eukaryontischer Initiationsfaktor-2“ eIF-2, welcher anschließend die RNA-Translation und somit die Synthese viraler Proteine hemmt. NS5A hemmt nach Bindung an die PKR dessen Phosphorylierungsaktivität, dies hat eine verminderte Aktivität von eIF-2 und eine vermehrte virale Proteinsynthese zur Folge. Die für die Bindung verantwortliche Interaktionsdomäne von NS5A liegt im Bereich der Aminosäuren 2009 bis 2274 und überlappt dementsprechend mit der ISDR. Patienten mit einer hohen Anzahl an Mutationen innerhalb dieser Aminosäuresequenz zeigen daher eine veränderte Bindungsaffinität von NS5A und der PKR. Es ist davon auszugehen, dass bei Patienten, die mit einer IFN-resistenten Form der Hepatitis C-Virus infiziert sind, eine verstärkte Bindung stattfindet und es demnach zur Hemmung der PKR kommt. Die Folge ist eine verminderte Phosphorylierung von eIF-2, eine Virusreplikation kann trotz Anwesenheit von Interferon stattfinden [05; 14; 19].

NS5B ist eine membran-assoziierte RNA-abhängige RNA-Polymerase des Hepatitis C-Virus [19]. Nach Eindringen in die Wirtszelle wird die virale RNA zum einen als mRNA zur Synthese der NS5B-Polymerase verwendet, zum anderen wird der positiv-RNA-Strang des Virusgenoms in eine komplementäre RNA negativer Polarität transkribiert. Dieser negativ-RNA-Strang dient als Vorlage für genomische (+)-RNA, die in sehr hoher Konzentration durch die NS5B-Polymerase gebildet wird und entweder zur Biosynthese viraler Proteine genutzt wird oder in neue Vorläufer-Virionen verpackt wird [13]. Es wird davon ausgegangen, dass NS5B mit NS3 und NS4A assoziiert ist und den Replikase-Komplex bildet [05].

1.1.4 Diagnose und Therapie

Eine Indikation zur HCV-Diagnostik besteht bei Patienten, die anamnestisch ein erhöhtes Transmissionsrisiko (Bluttransfusionen, intravenöser Drogenabusus, Tätowierungen et cetera) aufweisen. Weiterhin sollte die HCV-Diagnostik im Rahmen der Abklärung erhöhter Leberwerte oder einer Leberzirrhose erfolgen [20]. Diagnostische Nachweisverfahren sind zum einen die Bestimmung von Antikörpern, zum anderen die serologische Untersuchung auf Viruspartikel. Als *Screening*-Untersuchung dient der Antikörpernachweis. Dies geschieht mittels *Enzym-Immunoassay* (EIA), das einen Nachweis von Antikörpern gegen Strukturproteine (*Core*) und nicht-strukturelle Proteine der NS3-, NS4- und NS5-Region ermöglicht [07]. Erstmals können Anti-HCV-IgG-Antikörper 8-10 Wochen *post infectionem* im Serum nachgewiesen werden, bei einem chronischen Verlauf der Infektion persistieren die Antikörper [20]. Da es nicht bei allen Patienten zu einer Bildung von IgM-Antikörpern während der akuten Phase kommt, ist eine solche Bestimmung nicht sinnvoll [05]. Die Bestätigung eines positiven Antikörper-Suchtests ist mit rekombinantem *Immunoblot Assay* möglich [07]. Der Nachweis von freien Viruspartikeln im Serum oder Plasma ist auf qualitative und quantitative Weise möglich. Qualitative Tests basieren auf der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und sind zur Bestätigung einer Virämie bei positivem Antikörpernachweis indiziert. Außerdem können bei Patienten mit negativem EIA und

Verdacht auf eine frische HCV-Infektion durch eine qualitative PCR meist bereits innerhalb der ersten Wochen Viruspartikel nachgewiesen werden [07].

Eine quantitative Bestimmung der Viruslast sollte sowohl zur Indikationsstellung einer antiviralen Therapie, als auch zum Monitoring des Therapieverlaufs erfolgen [20]. Patienten mit einer initial hohen Viruslast zeigen ein schlechteres Therapieansprechen und weisen höhere *Relapse*-Raten auf. Um ein fehlendes Therapieansprechen zu erkennen, müssen unter der antiviralen Therapie in regelmäßigen Abständen Kontrollen der HCV-RNA im Serum stattfinden. Falls keine entsprechende Reduktion bzw. Negativierung der Viruslast erreicht werden kann, muss die Therapie abgebrochen werden [08]. Ebenfalls zur Standard-Diagnostik gehört die Genotypisierung des HCV-Virus durch Sequenzierung der HCV-Isolate. Der HCV-Genotyp ist ein Prädiktor für ein Therapieansprechen und hat Einfluss auf die voraussichtliche Therapiedauer [21; 22].

Die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion ist eine Kombinationstherapie, bestehend aus pegyliertem Interferon alfa (Interferon alfa an ein Polyethylenglycol-Molekül gekoppelt) und dem synthetischen Guanosin-Analogon Ribavirin [21; 23; 24]. Therapieziel ist die dauerhafte Viruselimination und die Ausheilung der Hepatitis. Damit verbunden ist eine Verhinderung der Krankheitsprogression zur Leberzirrhose und zum HCC. Ein dauerhaftes Therapieansprechen ist definiert als das Fehlen von HCV-RNA im Serum 24 Wochen nach Ende der antiviralen Behandlung [20]. Eine Therapieindikation besteht prinzipiell bei allen Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion, selbst bei normwertigen Aminotransferasen [25]. Insgesamt muss jedoch vor Einleitung einer Therapie eine Abwägung zwischen Nutzen und Risiken einer Therapie vorgenommen werden, da es unter der Behandlung zu ausgeprägten Nebenwirkungen kommen kann und die Ansprechraten je nach Genotyp und Begleiterkrankungen sehr unterschiedlich sind. Zu den Nebenwirkungen zählen vor allem Müdigkeit, grippe-ähnliche Symptome, Veränderungen des Blutbildes wie Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie, sowie neuropsychiatrische Symptome wie eine Depression [26; 27]. Bei Patienten mit dem in Europa am häufigsten vorkommendem Genotyp 1 kann mit der Standardtherapie nach einer Therapiedauer von 48 Wochen in circa 45-50% der Fälle ein dauerhaftes virologisches

Therapieansprechen erreicht werden. Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, sprechen nach einer Therapiedauer von 24 Wochen in circa 75-80% der Fälle dauerhaft auf eine antivirale Kombinationstherapie an [22; 28].

1.2 Interferone

Interferone (IFN) stellen eine strukturell verwandte Gruppe der Zytokine dar, die vielfältige biologische Funktionen erfüllen. Neben der Kontrolle des Zellwachstums ist die Rolle der Interferone als Regulatoren der angeborenen und spezifischen erworbenen Immunabwehr im Rahmen von Virusinfektionen von großer Bedeutung.

1.2.1 Typ I-Interferone und Signaling

Interferone werden in drei verschiedene Hauptklassen I bis III unterteilt [29]. Typ I-Interferone spielen eine essentielle Rolle im Rahmen der spezifischen Immunabwehr, sowohl durch direkte als auch indirekte antivirale Aktivität [30]. Neben IFN- α und IFN- β werden auch IFN- δ , IFN- ω , IFN- ϵ , IFN- ζ , IFN- κ und IFN- τ in diese Gruppe eingeordnet, wobei die kodierenden Gene auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert sind [29]. Zur Synthese und Sekretion der Interferone sind eine Vielzahl verschiedener Zellen, unter anderem Hepatozyten, Leukozyten, Fibroblasten und dendritische Zellen in der Lage [29, 31].

Als ein Induktor der Interferon-Genexpression gilt neben Endotoxinen und verschiedenen Mitogenen vor allem virale doppelsträngige RNA (dsRNA), welche als Zwischenprodukt der Virustranslation entsteht. Virale dsRNA wird je nach Zelltyp von unterschiedlichen Sensormolekülen detektiert. Intrazelluläre, vor allem zytoplasmatische Sensoren sind die ubiquitär exprimierten Helicasen RIG-I und

MDA-5, sowie die Proteinkinase R (PKR), eine RNA-abhängige Proteinkinase. Die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) kommen gebunden an die Zelloberfläche und die Endosomenmembran vor, so dass ihre Aktivierung durch Bindung extra- und intrazellulärer viraler dsRNA möglich ist [30] (Abbildung 2). Die aktivierten Sensorproteine lösen eine Signalkaskade aus, die über NF- κ B und IRF-3 eine Aktivierung des *Promotors* und die Synthese und Sekretion von IFN- β bewirkt [30; 31].

Die auto- und parakrine zelluläre Wirkung des sezernierten Interferons wird über den Typ I-Interferon-Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor besteht aus zwei heterologen Untereinheiten IFNAR-1 und IFNAR-2, deren Gene auf dem Chromosom 21 lokalisiert sind [31]. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten. Die intrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten sind mit den Januskinasen (JAK) TYK-2 und JAK-1 assoziiert, wobei TYK-2 an IFNAR-1 und JAK-1 an IFNAR-2 angelagert ist. Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten führt zu einer wechselseitigen Phosphorylierung von Tyrosinresten der JAKs und so zu einer Aktivierung der Kinasen [31; 32] (Abbildung 2). Nach Phosphorylierung dienen diese Enzyme als *Dockingstationen* für Transkriptionsfaktoren, die „*signal transducer and activator of transcription*“ (STAT), welche in latenter Form im Zytoplasma lokalisiert sind. Insgesamt werden sieben verschiedene STATs unterschieden, eine entscheidende Rolle im Interferon-*Signaling* kommt STAT-1 und STAT-2 zu [30]. Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren Tyrosinreste von STAT-1 und STAT-2. Nach ihrer Phosphorylierung rekrutieren diese einen dritten Faktor, den „*interferon regulatory factor-9*“ (IRF-9), wodurch es zu einer Komplexbildung dieser drei Moleküle kommt. Dieser Komplex, als „*interferon-stimulated gene factor-3*“ (ISGF-3) bezeichnet, transloziert in den Zellkern und bindet die DNA an der *Promotorregion* der Interferon-stimulierten Gene (*interferon-stimulated genes*, ISG). Gehemmt werden kann diese Signalkaskade von den Negativ-Regulatoren des Interferon-*Signalings* „*suppressor of cytokine signaling-3*“ (SOCS-3) und „*protein inhibitor of activated STAT*“ (PIAS) [30, 31]. Interessanterweise zeigt das *HCV-Core*-Protein eine IFN-antagonistische Wirkung, indem es sowohl die IFN-induzierte Tyrosinphosphorylierung von STAT-1 als auch

dessen nukleäre Translokation hemmt, vermutlich durch eine vermehrte Expression von SOCS-3 [33] (Abbildung 2).

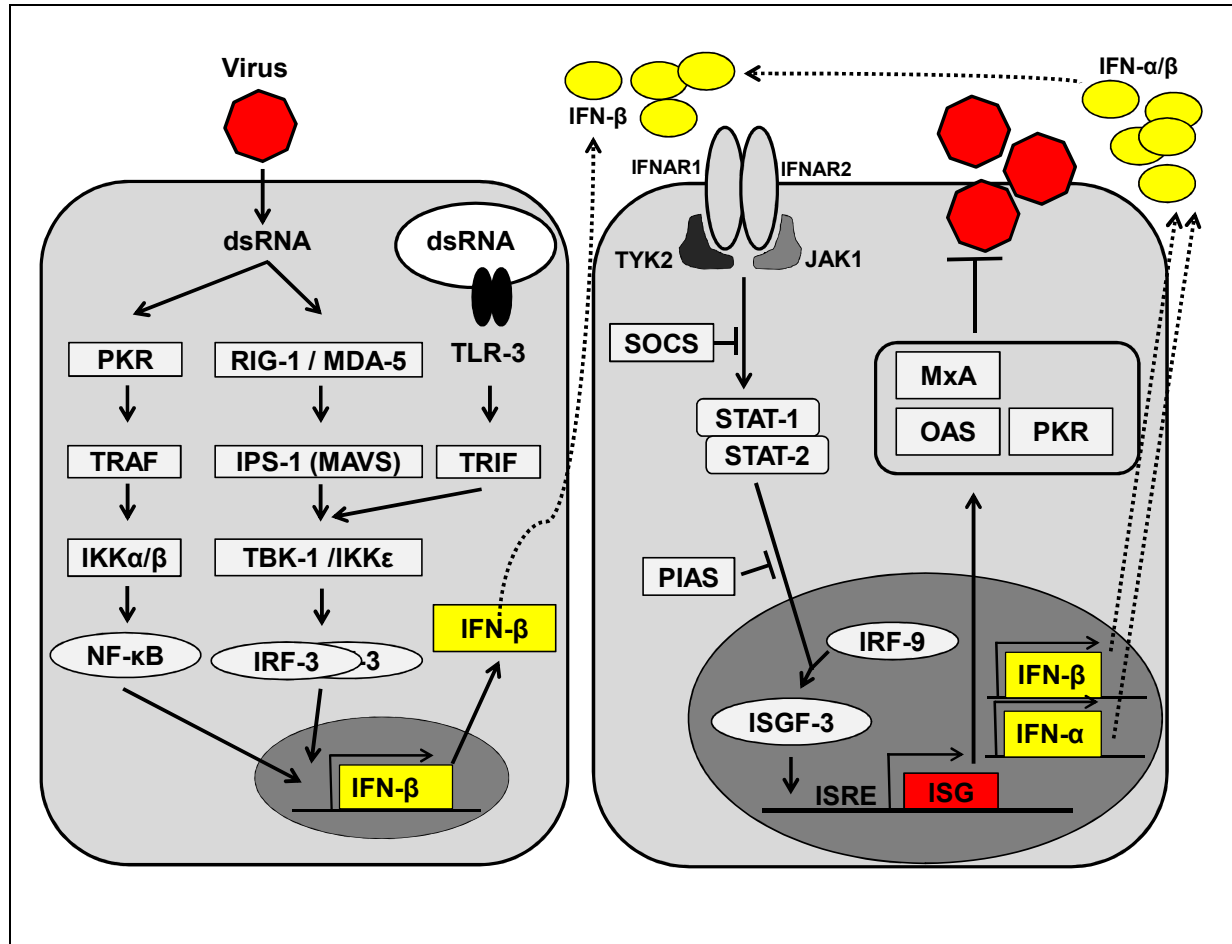


Abb. 2:

Übersicht Interferon-Signaling. Virale dsRNA wird von Sensormolekülen detektiert. Die aktivierten Sensorproteine lösen eine Signalkaskade aus, die über NF-κB und IRF-3 die Aktivierung des *Promotors* und die Synthese von IFN-β bewirkt. Dieses vermittelt seine Wirkung über den Typ I-Interferon-Rezeptor. Durch Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten kommt es zu einer Transphosphorylierung von Tyrosinresten von JAK1 und TYK2. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste der STATs, welche dann mit IRF-9 den Komplex ISGF-3 bilden. ISGF-3 transloziert in den Zellkern und bindet die *Promotorregion* der ISGs. Gehemmt wird die Kaskade von den negativ Regulatoren SOCS-3 und PIAS [nach 30]. dsRNA = doppelsträngige RNA; IFN-α/β = Interferon-α/β; IFNAR1/2 = Interferon-α/β receptor 1/2; IKKα/β/ε = inhibitor of NF-κB kinase α/β/ε; IPS-1 = Interferon-beta promoter stimulator-1; IRF-3/9 = Interferon regulatory factor-3/9; ISG = Interferon-stimulated genes; ISGF-3 = Interferon-stimulated gene factor-3; ISRE = Interferon stimulated response element; JAK1 = Janus kinase 1; MAVS = Mitochondrial antiviral-signaling protein; MDA-5 = Melanoma-differentiation-associated gene-5; NF-κB = nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells; OAS = 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase; PIAS = protein inhibitor of activated STAT; PKR = Proteinkinase R; RIG-1 = Retinoic acid inducible protein-1; SOCS = suppressor of cytokine signaling; STAT = signal transducer and activator of transcription; TBK-1 = Tank-binding kinase-1; TLR-3 = toll-like receptor-3; TRAF = TNF-receptor associated factor; TRIF = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β; Tyk2 = Tyrosine kinase 2.

1.2.2 Antivirale Proteine

Nach der Translokation von ISGF-3 in den Zellkern bindet dieser Komplex an eine spezifische DNA-Sequenz in der 5'-Region des *Promotors*. Diese Sequenz wird als „*interferon stimulated response element*“ (ISRE) bezeichnet und in interferon-induzierbaren Genen gefunden. Die Bindung von ISGF-3 bewirkt eine vermehrte Expression und Transkription dieser „Interferon-stimulierte Gene“ (*interferon-stimulated genes*, ISG) und zieht eine verstärkte Synthese antiviraler Proteine nach sich. Zu diesen Proteinen werden die Proteinkinase R (PKR), die Mx-Proteine, die 2'-5' Oligoadenylatsynthetase (OAS) und die RNase L gezählt [Abbildung 2] [30, 31].

1.2.3 Proteinkinase R (PKR)

Die humane PKR ist ein Protein aus 556 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 68kDa [05]. Es kommt vor allem zytoplasmatisch gebunden an Ribosomen vor, kann aber auch zu geringen Anteilen im Zellkern nachgewiesen werden. Die PKR wird ubiquitär in geringem Ausmaß in inaktiver Form exprimiert, nach einem Interferon-Stimulus wird die Transkription der PKR deutlich hochreguliert. Die als Intermediärprodukt der Virusreplikation entstehende doppelsträngige RNA bindet an die latent im Zytoplasma vorliegende PKR und bildet einen stabilen Komplex. Dies führt zu einer Dimerisierung und Aktivierung der PKR durch Autophosphorylierung [34]. Im aktivierten Zustand phosphoryliert die PKR verschiedene Substrate, unter anderem den „eukaryontischen Initiationsfaktor-2“ (eIF-2) an dessen α -Untereinheit, den nukleären Faktor NF κ B [35] und den Inhibitionsfaktor I κ B [31]. Der „eukaryontische Initiationsfaktor-2“ hat in aktivem Zustand die Aufgabe, methionyl-t-RNA als Initiationspunkt der Proteinbiosynthese zur 40S-Untereinheit der Ribosomen zu transportieren. Um eine Bindung der t-RNA zu ermöglichen, muss ein Austausch von GDP zu GTP am eIF-2-Protein stattfinden. Nach Freisetzung der Initiations-t-RNA am Ribosom wird das von eIF-2 gebundene GTP wieder zu GDP degradiert. Die Phosphorylierung von eIF-2 durch die PKR induziert einen stabilen Komplex von eIF-2 und GDP, so dass die Translation der RNA blockiert wird. Dies hat eine

Hemmung der viralen Proteinbiosynthese und damit der Virusreplikation zur Folge [05].

Eine Hemmung der PKR ist durch verschiedene Viren möglich, wie zum Beispiel Adenoviren, das Epstein-Barr-Virus, aber auch Reoviren und Vacciniaviren. Bezüglich des Hepatitis C-Virus besteht eine Interaktion von NS5A und möglicherweise auch dem Hüllprotein E2 mit der PKR, welche eine Verminderung der Phosphorylierungsaktivität der PKR zur Folge hat. Der Faktor eIF-2 liegt dann in aktiviertem dephosphoryliertem Zustand vor, eine Virusreplikation kann trotz Interferon-Stimulus stattfinden [31].

1.2.4 Mx-Proteine

Mx-Proteine gehören zu der Familie der dynamin-ähnlichen GTPasen, die konstitutiv exprimiert werden. Das menschliche Genom kodiert für zwei verschiedene Varianten MxA und MxB, deren Synthese durch IFN- α und IFN- β induziert wird, eine antivirale Aktivität konnte jedoch bislang nur für MxA nachgewiesen werden [31]. MxA liegt im Zytoplasma gebunden an Elemente des Zytoskeletts wie dem endoplasmatischen Retikulum, Actin- und Myosinfilamenten vor [05].

Für die antivirale Wirkung ist eine Oligomerisation des Proteins sowie die Bindung von GTP und dessen Hydrolyse zu GDP essentiell [36]. Der genaue Wirkungsmechanismus von MxA ist noch unbekannt, ein Einfluss auf das Protein-*Trafficking* wird angenommen. Studien mit dem Thogoto-Virus konnten eine Interaktion der MxA-GTPase mit dem viralen Nukleoprotein zeigen, welches mit dem Virusgenom assoziiert ist und in Kombination mit dem viralen Polymerase-Komplex das Nukleokapsid bildet. Diese Interaktion behindert einen Import des Nukleokapsids in den Kern der Wirtszelle und verhindert auf diese Weise eine Virustranskription und -replikation [32; 37]. Wird eine Zelle mit Interferon stimuliert, kommt es intrazellulär zu einem signifikanten Anstieg der Mx-Gen- und Protein-Expression [31].

1.2.5 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2'-5'-OAS) und RNase L

Die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase ist ein Enzym, welches nach Stimulation durch IFN- α und IFN- β gebildet wird. Drei verschieden große Isoformen der 2'-5'-OAS sind bekannt, die OAS1 mit einem Molekulargewicht von 40-46 kDa, die OAS2 mit einem Gewicht von 69-71 kDa und die OAS3 mit einem Gewicht von 100 kDa [31]. Eine Aktivierung dieser Enzyme findet durch die Anwesenheit von dsRNA statt, woraufhin die 2'-5'-OAS ATP zu Adenylatoligomeren mit der Form pppA(2'p5'A) $_n$ mit $n > 1$ polymerisiert [38]. Interessanterweise kann das Core-Protein des Hepatitis C-Virus die Gentranskription der 2'-5'-OAS verstärken und zusätzlich eine direkte Aktivierung des Enzyms bewirken [39].

Die RNase L ist eine konstitutiv exprimierte Endonuklease, die als Monomer inaktiv im Zytoplasma vorhanden ist. Sie wird durch Bindung der durch die 2'-5'-OAS synthetisierten Oligoadenylate aktiviert, ein Prozess, der mit der Homodimerisierung der RNase einhergeht. Ihre Funktion ist die Spaltung von viraler und zellulärer Einzelstrang-RNA, unter anderem mRNA und rRNA. In der Folge kommt es zu einer Inaktivierung der Ribosomen und Hemmung der viralen und zellulären Proteinbiosynthese [31; 38].

1.3 Gallensalze

1.3.1 Hepatozyten

Mit einem Gewicht von circa 1500g ist die Leber die größte Drüse im menschlichen Organismus. Sie nimmt im Stoffwechsel eine zentrale Rolle ein, indem sie sowohl metabolische Funktionen wie zum Beispiel Glykogenspeicherung, Synthese von

Serumproteinen und Gerinnungsfaktoren, als auch exokrine Funktionen wie die Gallesekretion wahrnimmt. Zu 80 Prozent besteht die Leber aus Leberepithelzellen, den Hepatozyten. Diese Zellen sind radiär entlang der Lebersinusoide angeordnet, haben eine polyedrische Form und zeigen eine polare Struktur und Funktionsweise. Mit ihrer basalen Membran grenzen die Hepatozyten an den perisinusoidalen Raum (Dissè-Raum). Da das Sinusendothel keine Basalmembran besitzt, gelangen alle Blutbestandteile mit Ausnahme der Blutzellen in den Dissè-Raum, so dass hier der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet und Syntheseprodukte sezerniert werden. Untereinander sind die Hepatozyten mit ihrer lateralen Membran über Desmosomen, *Tight junctions* und *Gap junctions* verbunden. Funktionell werden basale und laterale Abschnitt zur basolateralen Zellmembran zusammengefasst.

Dem basolateralen Pol steht der apikale Zellpol gegenüber, über den die Galle sezerniert wird. Hepatozyten bilden mit ihrer apikalen Membran die Wandbegrenzung der Gallekanälchen (Canaliculi biliferi), in die Mikrovilli ragen. Zur basolateralen Membran sind die Gallekanälchen über *Tight junctions* abgetrennt. Die von den Hepatozyten sezernierte Galle gelangt aus den Gallenkanälchen über ein kurzes Schaltstück (Hering-Kanälchen) in die interlobulären Gallengänge (Ductuli biliferi). Die Gallengänge sind mit Cholangiozyten ausgekleidet, die sowohl sekretorische als auch resorptive Funktion erfüllen und für circa 30-40% des Galleflusses verantwortlich sind [40].

1.3.2 Hepatobiliärer Transport

Gallensalze (GS) sind Metabolite des Cholesterins, die entweder als primäre GS in den Hepatozyten synthetisiert werden oder über die basolaterale Membran aus dem sinusoidalen Blut im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs aufgenommen werden. In humanen Hepatozyten werden als primäre GS Cholat und Chenodeoxycholat synthetisiert, die anschließend mit Taurin oder Glycin konjugiert werden, wobei die Glycin-Konjugate überwiegen [41]. Die mit der Galle sezernierten primären Gallensalze werden zum Teil unverändert im terminalen Ileum wieder

resorbiert. Die hier nicht resorbierten Gallensalze werden im Kolon durch bakterielle Enzyme in die sekundären Gallensalze Lithocholat und Desoxychololat dehydroxyliert und anschließend reabsorbiert. Die so resorbierten Gallensalze gelangen in das Pfortaderblut und können aus dem perisinusoidalen Raum wieder in die Hepatozyten aufgenommen werden [42].

Neben den Gallensalzen besteht die Galle aus Cholesterol und Phospholipiden, Wasser folgt der sezernierten Galle passiv durch spezifische Wasserkanäle (Aquaporine) der apikalen /Hepatozytenmembran [43].

- 1) Die sinusoidale Aufnahme der aus dem Dünndarm zurückresorbierten und der über das Pfortaderblut zur Leber zurückgeführten Gallensalze wird über verschiedene Transportproteine der basolateralen Membran vermittelt (Abbildung 3):

Das „*Na⁺-taurochololat cotransporting protein*“ (NTCP) wird nur in Hepatozyten exprimiert und stellt den wichtigsten sinusoidalen Transporter für Gallensalze dar [44]. Die Aufnahme der GS erfolgt natriumabhängig in einem stöchiometrischen Verhältnis $\text{Na}^+:\text{GS}$ von 2:1 in die Zelle [45]. Das Enzym hat eine hohe Affinität für konjugierte Gallensalze, so dass diese bevorzugt transportiert werden [46]. Im Gegensatz zu NTCP zeigen die verschiedenen „*organic anion transporting polypeptides*“ (OATPs) eine geringere Substratspezifität [47] so dass neben konjugierten und unkonjugierten Gallensalzen auch andere organische Anionen wie Steroide oder Schilddrüsenhormone in die Hepatozyten transportiert werden können [48]. Die zelluläre Aufnahme verläuft Natrium-unabhängig, stattdessen werden Anionen wie zum Beispiel Bikarbonat [49] oder Glutathion [50] im Gegenzug ausgeschieden. In der humanen Leber kommen die Enzym-Isoformen OATP1B1 [51] OATP1B3 [52], OATP2B1 [53], und OATP1A2 [54] vor. Über die humanen organischen Anionen Transporter (*organic anion transporter*, OAT) OAT2 und OAT5 [55; 56] wird die Natrium-unabhängige hepatozelluläre Aufnahme von Medikamenten wie Salicylaten oder Methotrexat vermittelt [56].

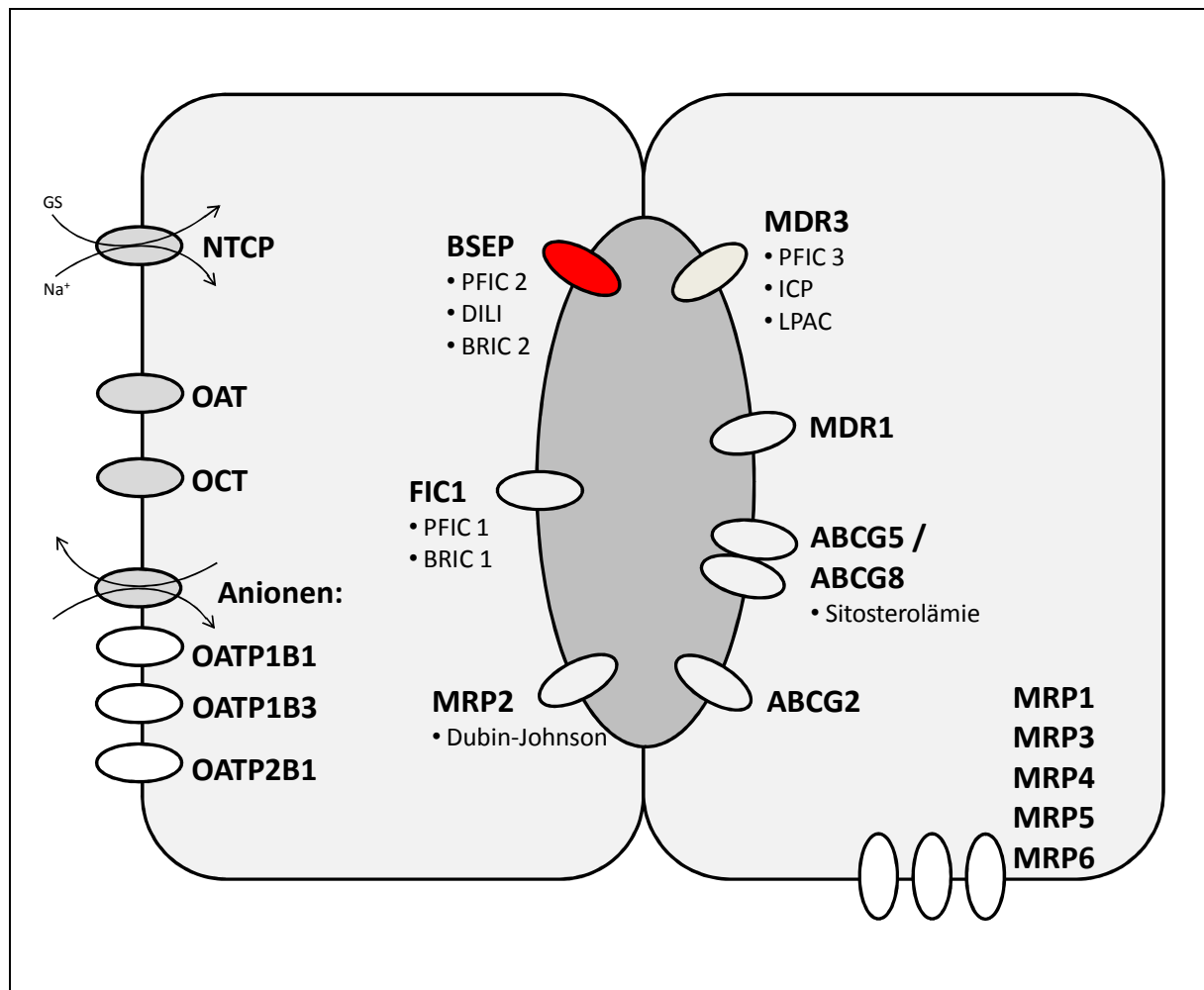


Abb. 3: **Übersicht über die hepatozellulären Transportproteine.** Die sinusoidale Aufnahme oder Abgabe der Gallensalze wird über das Transportproteine NTCP und die Isoformen der OATP und MRPs der basolateralen Membran vermittelt. Die biliäre Sekretion verschiedener Substrate erfolgt über BSEP, FIC1, MRP2, MDR1 und 3, ABCG2, 5 und 8. Eine verminderte Aktivität einiger Transporter ist mit den unterhalb aufgelisteten Erkrankungen assoziiert (nach [43]). ABCG 2/5/8 = *ATP-binding cassette sub-family G member 2/5/8*; BRIC = *benign recurrent intrahepatic cholestasis*; BSEP = *bile salt export pump*; DILI = *drug-induced liver injury*; FIC1 = *familial intrahepatic cholestasis type 1 gene product*; ICP = *intrahepatic cholestasis of pregnancy*; LPAC = *low phospholipid-associated cholestasis*; PFIC = *progressive familial intrahepatic cholestasis*; MDR = *multidrug resistance protein*; MRP = *multidrug resistance-associated protein*; NTCP = *Na⁺-Taurocholat cotransporting protein*; OAT = *organic anion transporter*; OATP = *organic anion transporting polypeptide*; OCT = *organic cation transporter*.

Für den Transport organischer Kationen ist das Protein „*organic cation transporter*“ [57] mit der humanen leberspezifischen Isoform OCT1 verantwortlich [58].

„*Multidrug resistance-associated proteins*“ sind Transporter, die eine Exportfunktion besitzen. An der apikalen Zellmembran ist das Transportprotein

MRP2 lokalisiert, während die Isoform MRP1 [59], MRP3 [60], MRP4 [61], MRP5 [62], und MRP6 [63], an der basolateralen Membran nachgewiesen werden können (Abbildung 3).

- 2) Für den transzellulären Transport der Gallensalze werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Neben einer Diffusion der Gallensalze, gebunden an intrazelluläre Proteine wie das „*hepatic bile acid-binding protein*“ (HBAB), ist auch ein vesikulärer Transport abhängig von den kontraktilen Elementen des Zytoskeletts möglich [64].
- 3) Die Sekretion der Gallensalze in die Gallekanälchen findet am apikalen Zellpol der Hepatozyten statt. Die Transporter, die diese Funktion erfüllen, gehören der Klasse der ABC- (*ATP-binding cassette*) Transporter-Superfamilie an. Die durch hydrolytische ATP-Spaltung gewonnene Energie ermöglicht einen Transport der Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten. Auf diese Weise wird eine deutlich höhere Konzentration im Gallekanalikulus als in den Hepatozyten erreicht [43, 65].

a) MDR1 und MDR3:

Die p-Glycoproteine MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) und MDR3 werden kanalikulär exprimiert [66], wobei MDR1 vor allem kationische Substanzen und Medikamente in die Galle transportiert [67], während MDR3 als Phospholipid-Floppase fungiert [68; 69].

b) MRP2:

Ein weiteres Protein der ABC-Transporter-Familie, welches für kanalikuläre Transportvorgänge eine Rolle spielt, ist das MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*). Zu den Substraten des Transporters zählen neben Gallensäuren und Bilirubin in konjugierter Form auch konjugiertes Sulfat,

Glutathion, Glucuronsäure, sowie Medikamente wie Methotrexat, Cisplatin und Anthrazykline [70; 71].

c) BSEP:

Die molekulare Struktur, Funktion und Regulation der *bile salt export pump* BSEP wird in Kapitel 1.4 separat dargestellt.

1.4 Bile Salt Export Pump (BSEP)

1.4.1 Struktur

Die *bile salt export pump* BSEP wurde erstmals im Jahr 1995 von Childs et. al. [72] als *sister of p-glycoprotein* (SPGP) beschrieben und von Gerloff et. al. [73] 1998 als ATP-abhängiger Gallensalztransporter BSEP charakterisiert. Der entsprechende Genlocus liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 2. Die cDNA des menschlichen BSEP-Proteins enthält 3963 kodierende Basenpaare und verschlüsselt ein 1321 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von circa 140-170 kDa [74; 75; 76]. BSEP gehört in die Subgruppe B der Familie der *ATP-binding cassette-transporter* und wird als ABCB11 bezeichnet. Wie alle ABC-Transporter weist BSEP zwei homologe Hälften mit jeweils 6 aus α -Helices bestehenden Transmembran-Domänen auf. Jede dieser Domänen ist mit einer zytoplasmatischen ATP-bindenden Domäne, einer sogenannten *nucleotide-binding fold* (NBF) assoziiert. An diesen Nukleotidbindungsstellen wird durch hydrolytische Spaltung von ATP die Energie zum Transport der GS über die apikale Hepatozytenmembran gewonnen. Innerhalb dieser NBF liegt jeweils ein Walker A-, ein Walker B-Motiv, sowie eine ABC-Domäne [74; 75; 77; 78] (Abbildung 4). Nachgewiesen werden konnte BSEP in der apikalen

Membran der Hepatozyten, aber auch in humanen Testis, im Verdauungstrakt und in cerebralen Cortex [79].

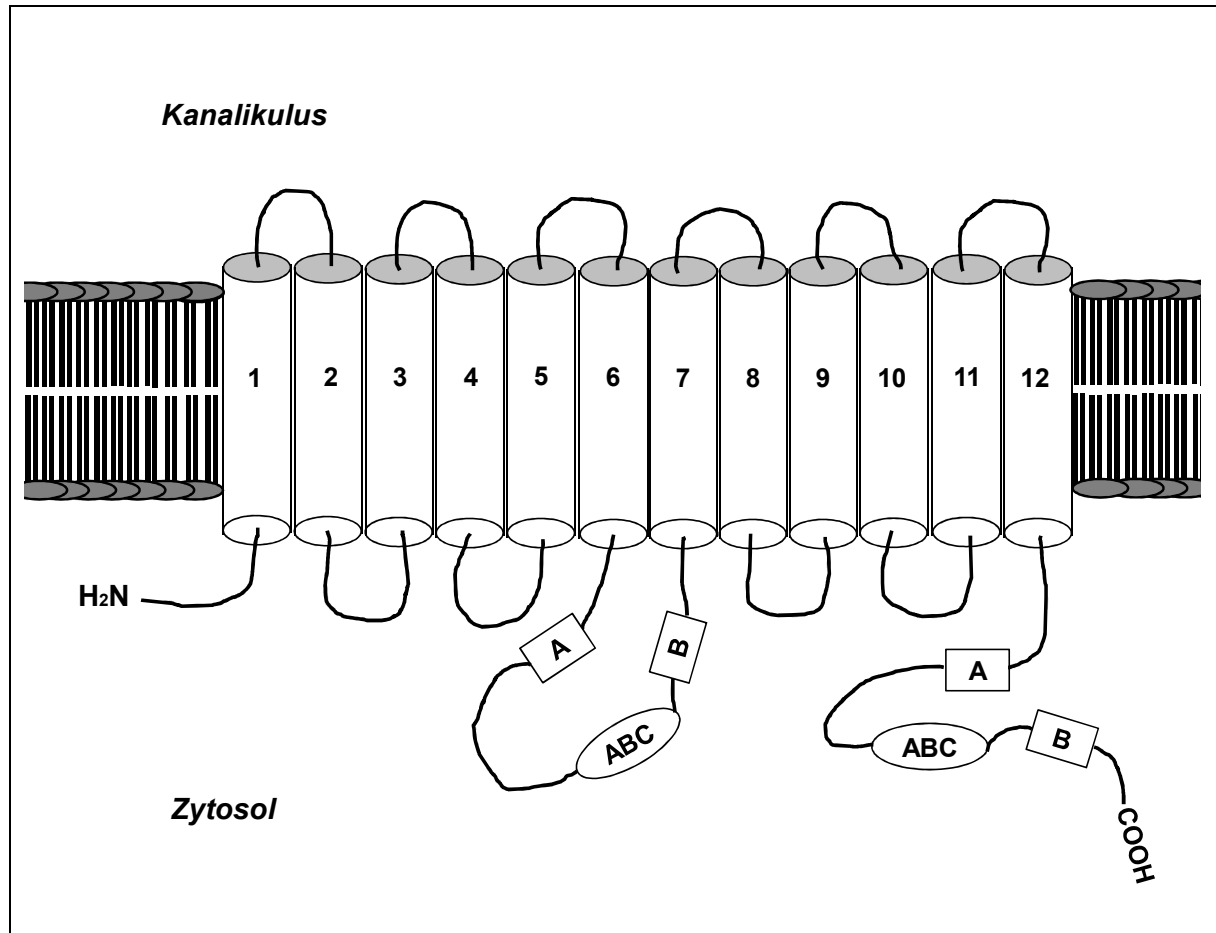


Abb. 4: **Molekulare Struktur der bile salt export pump BSEP** (nach [77]). A = Walker A-Motiv; ABC = ABC-Domäne; B = Walker B-Motiv; COOH = C-terminale Carboxylgruppe; H₂N = N-terminale Aminogruppe.

1.4.2 Funktion

BSEP ist an den Mikrovilli der kanalikulären Hepatozytenmembran lokalisiert und nimmt eine zentrale Rolle in der kanalikulären Gallesekretion ein. Aufgrund des energieabhängigen Transports kann BSEP einen Konzentrationsgradienten für Gallensalze zwischen Intrazellulärraum und Gallekanälchen von 5 µmol/l versus 1000 µmol/l aufbauen [77]. Die größte Affinität weist BSEP für monovalente

konjugierte Gallensalze auf, so dass Taurochenodeoxycholat (TCDC) die höchste Transportrate zeigt, gefolgt von Taurocholat (TC), Tauroursodeoxycholat (TUDC) und Glycocholat (GC) in absteigender Reihenfolge [74; 77; 80].

Mutationen innerhalb des für BSEP kodierenden Gens gehen mit verschiedenen cholestatischen Erkrankungen einher: Die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2) ist eine schwere autosomal rezessiv vererbte Lebererkrankung, die sich bereits im Kindesalter manifestiert und bis zur Lebertransplantation führen kann. Aufgrund von Gendefekten auf dem Chromosom 2q24 fehlt BSEP in der kanalikulären Membran [76] und es kommt zu einer starken Beeinträchtigung der GS-Sekretion, so dass in der Galle GS-Konzentration von <1% des Normwertes gefunden werden können [81]. Gleichzeitig findet sich eine Erhöhung der GS im Serum bei niedrigem bis normalem Serum-Cholesterin und normwertiger gamma-GT [75; 76; 81; 82]. Darüber hinaus konnten Mutationen im BSEP-Gen als Ursache der benignen rekurrenten intrahepatischen Cholestase (BRIC) Typ 2 [83] charakterisiert werden sowie die Varianten N591S mit der schwangerschafts-induzierten Cholestase (ICP) [84; 85] und der Polymorphismus V444A der medikamenten-induzierten Cholestase (DIC) [86] assoziiert werden.

1.4.3 Regulation

Die Menge der Gallensalztransporter in der apikalen Zellmembran ist genau reguliert, um ein konstantes Milieu an Gallensalzen innerhalb der Hepatozyten aufrechtzuerhalten. Eine erhöhte intrazelluläre Gallensalzkonzentration bewirkt daher im Sinne einer positiven *feed-forward* Regulation eine vermehrte Synthese und einen verstärkten Einbau von BSEP in die kanalikuläre Membran und hat damit eine stärkere Ausscheidung der Gallensalze zur Folge [80]. Für die hepatozelluläre Integrität ist dies von vitaler Bedeutung, da erhöhte intrazelluläre Gallensalzkonzentrationen durch liganden-unabhängige Aktivierung von CD95 die Apoptose der Hepatozyten induzieren können [87]. Die Regulation findet auf

verschiedenen Wegen statt, wobei zwischen einer Regulation auf Langzeitebene und auf Kurzzeitebene unterschieden werden muss.

Regulation auf Langzeitebene bedeutet eine bedarfsabhängig verstärkte oder verminderte Gentranskription und Proteinbiosynthese. Dabei fungiert der nukleäre Hormon Rezeptor Farnesoid X Rezeptor (FXR) als Sensormolekül für hydrophobe Gallensalze. Konzentrationsabhängig wird dieser durch hydrophobe Gallensalze aktiviert und bildet mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) einen heterodimeren Komplex [77; 79]. Dieser Komplex bindet an eine spezifische Sequenz in der *Promotorregion* des für BSEP kodierenden Genabschnitts. Diese Bindung bewirkt eine Aktivierung des *Promotors* und damit eine vermehrte Gen- und BSEP-Expression und nachfolgend eine vermehrte kanalikuläre Gallensalzsekretion [79; 88]. Eine FXR-abhängige Transaktivierung von BSEP kann durch eine direkte Interaktion mit dem Vitamin D-Rezeptor nach Bindung von Vitamin D gehemmt werden [89]. Stimulierend auf die BSEP-Synthese, nachweisbar durch erhöhte BSEP-mRNA-Level, wirken sich hypoosmolare Bedingungen und auch Glukokortikoide aus [75].

Die Regulation auf Kurzzeitebene ermöglicht den Hepatozyten, die Gallesekretion in Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Stimuli innerhalb kurzer Zeit anzupassen [74]. Die dafür zuständigen Mechanismen umfassen neben dem exozytotischen Einbau und endozytotischen Ausbau von BSEP-Proteinen in die apikale Zellmembran eine posttranskriptionelle Modifizierung der Proteinstruktur durch Phosphorylierung, sowie die Beeinflussung des Membran-*Targetings* [90; 91].

BSEP-Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und anschließend in Vesikeln entlang des mikrotubulären Zytoskeletts zur kanalikulären Zellmembran oder in einen subkanalikulären Speicherpool transportiert. Von diesem *Pool* aus können bei Bedarf die BSEP-Transporter mittels Exozytose in die kanalikuläre Zellmembran integriert werden. Für das Vorliegen eines *Pools* spricht, dass es trotz Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese bei entsprechender Stimulation kurzfristig zu einer Choleresse kommt. Eine Zerstörung der Mikrotubuli geht jedoch mit einer verminderten Inkorporation von BSEP in die Hepatozytenmembran und fehlendem Ansprechen auf den Stimulus einher [79; 92]. Untersuchungen legen nahe, dass zwei separate *Pools*

existieren, da die Translokation der Transporter auf verschiedene, voneinander unabhängige Wege stimuliert werden kann. Dazu wurde im Tierversuch Ratten intravenös dibutyryl-cAMP (dBcAMP) oder Taurocholat infundiert, anschließend konnte jeweils ein schneller Einbau von BSEP-Proteinen in die Membran und eine gesteigerte Gallesekretion beobachtet werden [93; 94]. Die Wirkung von Taurocholat wird über die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), die Wirkung von cAMP vermutlich über die Proteinkinase A (PKA) vermittelt [95; 96]. In ähnlicher Weise findet bei hypoosmolarer oder glutamin-induzierter Zellschwellung eine beschleunigte Membraninkorporation von BSEP statt. Umgekehrt kommt es bei hyperosmolarer Zellschrumpfung, sowie bei Lipopolysaccharid-vermittelter Sepsis zu einer vermehrten Endozytose von BSEP [97; 98]. Insgesamt herrscht unter physiologischen Bedingungen in diesen *Pools* eine circa 6fach höhere BSEP-Konzentration als in der kanalikulären Membran [99].

Das *Targeting* von BSEP vom Golgi-Apparat zur kanalikulären Membran wird durch verschiedene Kinasen reguliert. Tauroursodeoxycholat (TUDC) dient als Aktivator der MAP-Kinasen (MAPK) vom Typ p38^{MAP} und der Proteinkinase C (PKC). Durch Aktivierung der p38 MAP-Kinasen wird eine verstärkte Choleresse ausgelöst, indem sie ein vermehrtes *Targeting* von BSEP zur Hepatozytenmembran bewirkt [100]. Die Rolle der PKC-Isoformen im Membrantargeting von BSEP ist umstritten. Von Noe et al. konnte [96] gezeigt werden, dass BSEP im Mausmodell von verschiedenen Isoformen der PKC phosphoryliert wird. In dieser Studie führte eine Phosphorylierung durch die Calcium-abhängige Isoform PKC α zu einer 18fach höheren Transportaktivität des Proteins, während eine Phosphorylierung der Calcium-unabhängigen Isoform PKC ϵ eine Verminderung der Aktivität nach sich zog [96]. Hingegen konnte durch Kubitz et al. [101] nachgewiesen werden, dass im intakten Organ die Aktivierung der PKC α zu einem endozytotischen Ausbau von BSEP und nachfolgend zu einer Cholestase führt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass in HepG2-Zellen die Hemmung aller PKC-Isoformen zu einer Verminderung des BSEP-*Targetings* an die kanalikuläre Membran führte. Die isolierte Inhibition der Calcium-abhängigen PKC-Isoformen blockierte hingegen das Targeting nicht, so dass eine Regulation durch die Calcium-unabhängigen Isoformen (z. B. durch die PKC ϵ) anzunehmen ist. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der PKC α

einen cholestatischen Effekt hat und am Membrantargeting von BSEP die Calcium-unabhängigen PKC-Isoformen beteiligt ist.

1.4.4. V444A-Polymorphismus

Das BSEP-Protein besitzt die größte Bedeutung für die hepatozelluläre Gallensalzsekretion. Bei einer Defizienz dieses Transporters kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation potentiell toxischer Gallensalze und nachfolgend zu einer Schädigung der Leberzellen [102].

Beim Menschen ist ein nicht-synonymer *single-nucleotide-polymorphism* (SNP) im Exon 13 des BSEP-Gens bekannt, bei dem an Nukleotidposition 1331 ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin (1331T>C) besteht (rs2287622). Diese Genvariante führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz an Position 444 des BSEP-Proteins, so dass bei Vorliegen des T-Allels (Sequenz: GTC) Valin und bei Vorliegen des C-Allels (Sequenz: GCC) Alanin nachgewiesen werden kann. In einer gesunden kaukasischen Kontrollpopulation wurde die Frequenz des Wildtyp-Allels mit Werten zwischen 0.458 [85] und 0.513 [84] angegeben. Interessanterweise liegt die Frequenz des 1331-T unterhalb der Frequenz des 1331-C-Allels, da es aber evolutionär hochkonserviert ist, wird es als Wildtyp-Allel bezeichnet [103]. Mit Hilfe der Software PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping version 2, Harvard University, Boston, MA, USA, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) kann abgeschätzt werden, ob eine Genvariante strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf ein Protein hat und somit als benigne einzuschätzen ist oder deletäre Auswirkungen zeigt. Durch Abgleich der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mit homologen Genen aus verschiedenen Spezies kann festgelegt werden, ob die Sequenz evolutionär konserviert ist, zum anderen wird durch 3D-Analysen vorhergesagt, ob eine Variante die Struktur und damit auch die Funktion des Proteins beeinflusst. Diese Vorhersage wird in Form des sogenannten „*position-specific independent count*“ (PSIC) ausgegeben. Liegt dieser Wert im Bereich 0.000 bis 0.999, ist von einer benignen Genvariante auszugehen. Liegt der Wert bei >2.00, gilt

die Variante als schädigend. Der für den V444A-Polymorphismus errechnete Wert liegt bei 0.604, so dass dieser SNP als gutartig gewertet werden muss.

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die homozygot für den Polymorphismus (C/C) sind, im Vergleich zu Patienten, die homozygot für den Wildtyp (T/T) sind, eine geringere BSEP-Expression aufweisen. Bei Homozygotie für das C-Allel kommt es wahrscheinlich konsekutiv zu einer höheren intrazellulären Gallensalzkonzentration [102; 104]. Dies geht allerdings nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Gallensalzkonzentration im Serum einher, da die Serumspiegel auch von der Aufnahme aus dem Blut über die sinusoidale Membran und dem enterohepatischen Kreislauf abhängig sind [105]. Verschiedene cholestatische Erkrankungen konnten mit dem V444A-Polymorphismus assoziiert werden, wobei die Reduktion der Membranexpression mit der Schwere der Cholestase korreliert [106]. Patientinnen, die homozygot für das polymorphe Allel (C/C) sind, haben ein signifikant erhöhtes Risiko, eine schwangerschafts-induzierte Cholestase zu entwickeln [84; 85; 107; 108]. Des Weiteren haben Personen mit dem Polymorphismus ein erhöhtes Risiko einen medikamentös-toxischen Leberschaden zu erleiden. So konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem medikamentös-toxischen Leberschaden das C-Allel mit einer *Odds-Ratio* von 4 (1.3; 11.9) nachgewiesen werden kann [86].

1.5 Interleukin-28

Im Jahr 2002 wurde eine neue Gruppe strukturell verwandter Interferon-ähnlicher Zytokine beschrieben. Diese umfasst das Interleukin-28A (IL-28A), Interleukin-28B (IL-28B) und Interleukin-29 (IL-29). Synonym werden die Bezeichnungen Interferon- λ 1 (IFN- λ 1), Interferon- λ 2 (IFN- λ 2) und Interferon- λ 3 (IFN- λ 3) verwendet [109; 110]. Diese Gruppe dieser Zytokine wird als Interferon Typ III klassifiziert und zur Interleukin-10-Interferon-Familie gezählt [111]. Die kodierenden Gene sind auf dem menschlichen Chromosom 19 lokalisiert und enthalten, im Gegensatz zu den für Typ

I-Interferon kodierenden Genen, mehrere Introns [112]. Die Expression der Typ III-Interferone wird TLR-abhängig durch virale dsDNA, dsRNA, (+)ssRNA und (-)ssRNA induziert, sowie durch das bakterielle Lipopolysaccharid LPS [111; 112; 113]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von IFN- λ durch die Typ I-Interferone getriggert werden kann. Interferone vom Typ III müssen daher selbst zu den Interferon-stimulierten Genen gezählt werden [113]. Zellen, die in der Lage sind Interferon- λ zu bilden, sind unter anderem Dendritische Zellen, Alveolarepithelzellen und Hepatozyten [114]. Ähnlich der Typ I-Interferone weisen Typ III-Interferone antivirale, antiproliferative und immunregulatorische Eigenschaften auf [112; 115]. Diese Wirkungen werden durch Aktivierung des membrangebundenen Interferon-lambda-Rezeptor1 (IFNLR1), eines spezifischen Klasse II-Zytokin-Rezeptors, vermittelt. Dieser Rezeptor ist ein heterodimerer Komplex, bestehend aus der IL-10-Rezeptor2-Untereinheit (IL-10R2) und der Interleukin-28 Rezeptor1-Untereinheit (IL-28R1) (Abbildung 5). Das kodierende Gen für IL-10R2 ist auf dem Chromosom 22 lokalisiert, während das kodierende Gen für IL-28R1 auf dem Chromosom 1 liegt [109; 111].

Im Gegensatz zu der ubiquitären Expression von IL-10R2 ist die von IL-28R1 streng reguliert. Die für IL-28R1 kodierende mRNA kann beispielsweise nicht in hämatopoetischen Vorläuferzellen [114] und frisch isolierten Monozyten nachgewiesen werden [116], in Hepatozyten wird IL-28R1 jedoch exprimiert [111].

Nach Bindung von Interferon- λ an die IL-28R1-Untereinheit kommt es zur Fusion mit der IL-10R2-Untereinheit [117]. Dabei ist vermutlich IL-28R1 mit JAK-1 assoziiert, IL-10R2 mit TYK-2. Wie bei dem Typ I-Interferon-Rezeptor führt eine Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten zu einer wechselseitigen Phosphorylierung und so zu einer Aktivierung der Kinasen. Analog zum *Signaling* des Typ I-Interferon-Rezeptors wird auch beim Typ III-Interferon-Rezeptor über STAT1, STAT2 und IRF9 eine vermehrte Expression und Transkription der Interferon-stimulierten Gene und eine vermehrte Synthese antiviraler Proteine bewirkt (Abbildung 5) [111; 119].

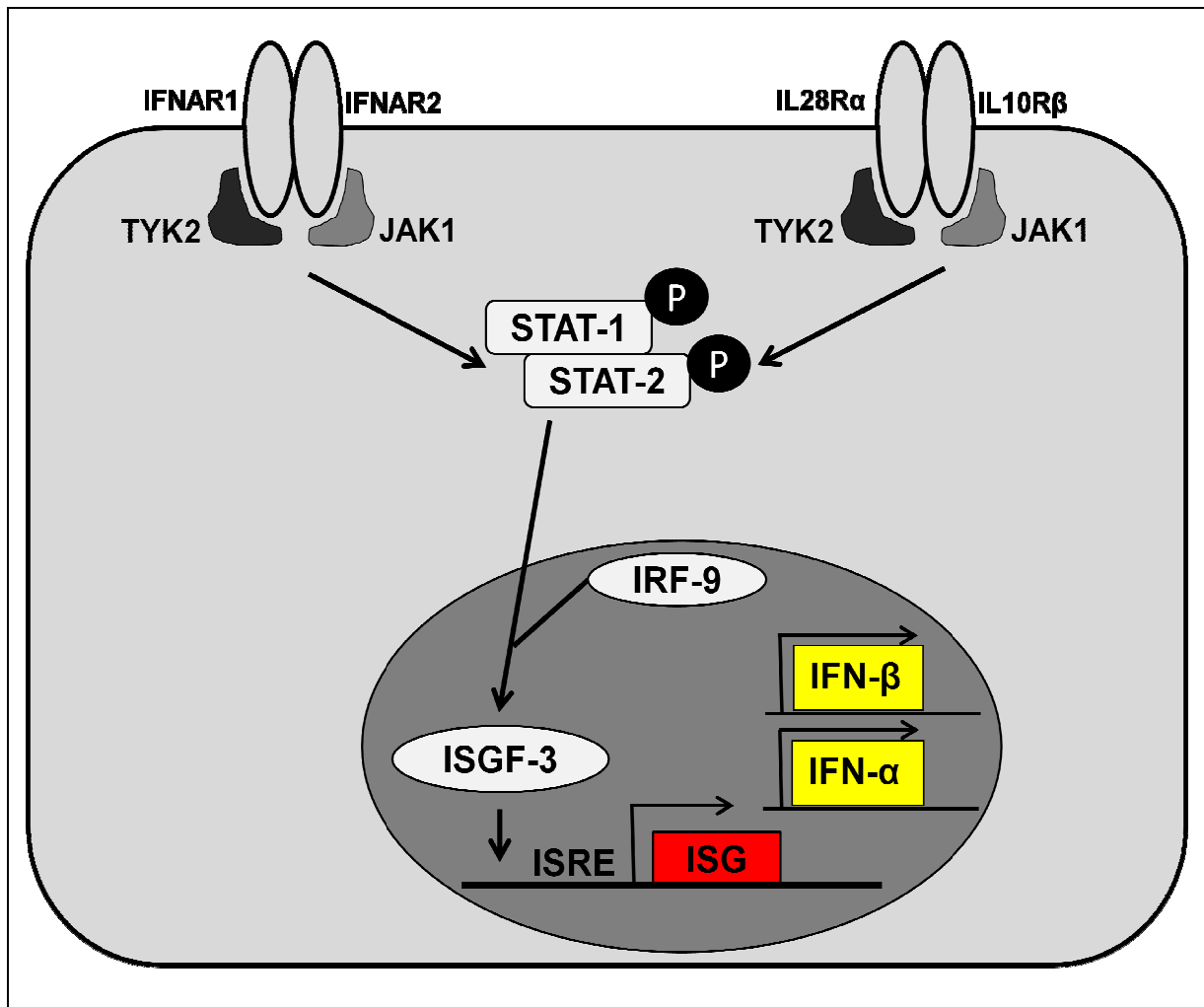


Abb. 5: **Typ-III-Interferon-Signaling.** Typ-III-Interferone binden an einen Rezeptor, der aus einer IL-10-Rezeptor2- und einer Interleukin-28 Rezeptor1-Untereinheit besteht. Das nachfolgende intrazelluläre *Signaling* ist identisch mit dem der Typ-I-Interferone: durch Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten kommt es zu einer Transphosphorylierung von Tyrosinresten von JAK1 und TYK2. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste der STATs, welche dann mit IRF-9 den Komplex ISGF-3 bilden. ISGF-3 transloziert in den Zellkern und bindet die *Promotorregion* der ISGs (nach [114]). IFN- α/β = Interferon- α/β ; IFNAR1/2 = Interferon- α/β receptor 1/2; IL10R β = Interleukin 10 receptor subunit β ; IL28R α = Interleukin 28 receptor subunit α ; IRF-9 = Interferon regulatory factor-9; ISG = Interferon stimulated gene; ISGF-3 = Interferon-stimulated gene factor-3; ISRE = Interferon stimulated response element; JAK1 = Janus kinase 1; STAT = Signal transducer and activator of transcription; Tyk2 = Tyrosine kinase 2.

Verschiedene Studien haben die antivirale Aktivität der λ -Interferone gegenüber dem Hepatitis C-Virus untersucht. Durch Robek et al. konnte eine Blockade der Hepatitis C-Virusreplikation durch Interferon- λ in huh7 Zellen, sowie weiterhin eine Hemmung der Replikation des Hepatitis B-Virus in einer Hepatozyten-Zelllinie im Mausmodell gezeigt werden [116]. Eine Phase 1b Studie mit pegyliertem Interferon- λ als Monotherapie oder in Kombination mit Ribavirin zur Behandlung von Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion wurde im Jahr 2010 veröffentlicht [119]. Im Rahmen

dieser Studie konnte eine deutliche antivirale Aktivität gegenüber dem Hepatitis C-Virus *in vivo* nachgewiesen werden. Gleichzeitig traten bei den behandelten Probanden, am ehesten aufgrund der eingeschränkten Rezeptor-Expression, weniger hämatologische Nebenwirkungen als bei der Therapie mit pegyliertem Interferon- α auf.

Die Behandlung mit pegyliertem Interferon- λ kann demnach in Zukunft bei der Behandlung der chronischen HCV-Infektion eine alternative Behandlungsmethode zum pegylierten Interferon- α darstellen.

1.5.1 Interleukin-28B-Polymorphismus bei der Therapie der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion

Im Jahr 2009 wurden im Rahmen von vier Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) sieben verschiedene Genpolymorphismen auf dem Chromosom 19 in der Nähe der für Interleukin-28B kodierenden Sequenz gefunden [120]. Diese SNPs korrelieren signifikant mit dem Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion mit dem Genotyp 1 [120; 121; 122; 123]. Bei der Variante rs8099917 kommt es an der Stelle 44435005 zu einem Basenaustausch von Guanin zu Thymin (44435005G->T) 8 Kilobasen *downstream* vom IL-28B und 16 Kilobasen *upstream* von IL-28A [120; 122]. Diese Genvariante zeigt die stärkste Assoziation mit einer spontanen Viruselimination und mit einer Viruselimination unter antiviraler Therapie [123]. Patienten, die homozygot für das G-Allel sind oder den Polymorphismus heterozygot (GT) aufweisen, zeigen signifikant schlechtere Ansprechraten als Patienten, die homozygot für das T-Allel sind. Das G-Allel wird daher als das „Risiko-Allel“ und das T-Allel als „*Response*-Allel“ bezeichnet [123]. Auf welche Weise diese Genvariante den Therapieerfolg beeinflusst, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden.

2. Fragestellung

Erhöhte Gallensalz-Spiegel im Serum sind mit einer eingeschränkten Interferon-Wirkung assoziiert, wie durch Podevin et al. [124] und Chang et al. [125] gezeigt werden konnte. Hier wurde ein Einfluss der Gallensalze auf die Aktivität der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase und auf die Regulation des Transkriptionsfaktor STAT-1 gemessen.

Der V444A-Polymorphismus führt zu einer verminderten Expression der Gallensalzexportpumpe BSEP.

Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, ob der V444A-Polymorphismus Einfluss auf den Therapieerfolg bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion hat. Da Patienten, die homozygot für den Polymorphismus sind, aufgrund der verminderten BSEP-Expression höhere hepatozelluläre Gallensalzkonzentrationen aufweisen können als Patienten, die homozygot für den Wildtyp sind, muss als Hypothese gelten: HCV-Patienten, die bezüglich des V444A-Polymorphismus homozygot sind, sprechen signifikant schlechter auf eine antivirale Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin an, als Patienten, die homozygot für den Wildtyp sind. Das Therapieansprechen wird definiert als ein negativer Virusnachweis sechs Monate nach Beendigung der antiviralen Therapie.

Der Interleukin-28B-Polymorphismus stellt eine genetische Variante dar, die der aktuellen Studienlage nach einen signifikanten Einfluss auf die Viruselimination und das Therapieansprechen bei einer chronischen HCV-Infektion hat. Ein weiteres Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, ob der V444A-Polymorphismus als unabhängiger Faktor vom IL-28B-Polymorphismus das Therapieansprechen beeinflusst. Ferner soll untersucht werden, ob es synergistische Effekte der beiden Genvarianten gibt. Sprechen Patienten, die homozygot für den V444A-SNP sind und das *Response*-Allel des IL-28B-Polymorphismus aufweisen, besser auf eine antivirale Therapie an als Patienten, welche das IL-28B Risiko-Allel tragen?

3. Material und Methoden

3.1 Material- und Geräteliste

- DNA Blood Mini Kit (QIAGEN; Hilden, Deutschland; Cat. No. 51106)
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN; Hilden, Deutschland; Cat. No. 28106)
- Taq DNA Polymerase 1000 units; 5U/μl (QIAGEN; Hilden, Deutschland; Cat. No. 201203)
- dNTP PCR Nucleotide Mix 10mmol (Roche Applied Science; Mannheim, Deutschland; Cat. No. 11814362001)
- 10-fach Coraload PCR Puffer (QIAGEN; Hilden, Deutschland; Cat. No. 130182325)
- Primer BSEP Exon 13; 1pmol/ μl (Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Deutschland)

forward-Primer Exon 13 for; Sequenz 5'-gggcatacataaacgcacac-3'

reverse-Primer Exon 13 rev; Sequenz 5'-caggacagtctcaatgtatg-3'

- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland; P/N: 4309155)
- Thermo-Fast 96 ABGene PCR Plate (Thermo Fisher Scientific; Schwerte Deutschland; Cat.-No. AB06000)
- Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland)

- 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems; Darmstadt Deutschland)
- 7500 System SDS Software Version 1.4 (Applied Biosystems; Darmstadt Deutschland)
- TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems; Darmstadt Deutschland; Assay ID: C_11710096_10; Reference SNP Number: rs8099917; Part Number: 4351376)
- ABI Prism® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Darmstadt Deutschland)
- Cellstar 15ml Falcon (Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland, Cat. No. 188271)
- Safe-lock Tube 1,5ml (Eppendorf; Hamburg, Deutschland; Order No. 0030120086)
- Nano-Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific; Schwerte Deutschland)
- SPSS statistics Version 18 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland)

Zur Analyse des V444A-Polymorphismus wurde von 254 Patienten mit einer bekannten chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion jeweils eine Probe aus venösem Vollblut entnommen. Jeder Patient unterschrieb nach entsprechender Aufklärung vor der Blutabnahme eine Einverständniserklärung zur genetischen Untersuchung und Diagnostik. Jede Probe wurde in einem EDTA-Röhrchen gesammelt.

Für die Untersuchung des Interleukin-28B Polymorphismus wurde von 352 Patienten mit einer bekannten chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion jeweils eine Probe aus venösem Vollblut entnommen. Eine entsprechende Aufklärung zur genetischen Untersuchung und Diagnostik wurde auch hier vor der Blutentnahme durchgeführt, ebenso wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Jede Probe wurde in einem EDTA-Röhrchen gesammelt und bei -20°C tiefgefroren.

3.2 Ethikvotum

Von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf wurde das Protokoll dieser Studie „Bedeutung von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) für hepatobiliäre Transporter“ (Studennummer 2875) geprüft. Es bestanden weder ethische noch rechtliche Bedenken gegen die Durchführung.

3.3 Isolation der DNA

Die Blutproben wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur (15-25°C) erwärmt. Anschließend wurde die DNA gemäß Protokoll (Blood and Body Fluid Spin Protocol) mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit isoliert und in einer 1,5 ml *Safe-lock tube* konserviert.

3.4 Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion und Schmelzkurvenanalyse

Die Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time PCR*) und die anschließende Schmelzkurvenanalyse wurden mit dem 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und 7500 System SDS Software Version 1.4 durchgeführt.

Für jeden PCR-Ansatz wurden 3 DNA-Referenzproben mit den SNP-Konstellationen TT / TC /CC von rs2287622 und 45 Proben der isolierten Patienten-DNA verwendet. Die DNA der Referenzproben wurde zuvor einmalig sequenziert und so der Genotyp bezüglich des V444A-Polymorphismus bestimmt. Es wurde pro Ansatz je eine für den Polymorphismus homozygote, eine heterozygote und eine für den Wildtyp homozygote Referenzprobe verwendet.

Von jeder Patienten-DNA-Probe wurden jeweils 2,7µl in eine 1,5ml *Safe-lock Tube* pipettiert.

Der *Primermix* wurde mit dem *Primerpaar* des *Primers* BSEP Exon 13 in einem separaten Cellstar 15ml Falcon hergestellt. Dazu wurden 85µl des *Forward-Primers*

Exon 13 for und 85µl des *Reverse-Primers* Exon 13 rev, sowie 680µl Aqua dest. verwendet.

Typ	Sequenz
Forward-Primer	5'-gggcatacataaacgcacac-3'
Reverse-Primer	5'-caggacagtctcaatgtatg-3'

Abb.6: Sequenzen des für die real-time PCR verwendeten Primerpaares

Für den *Master Mix* wurden 443µl Aqua dest. und 2x 747µl des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green PCR Master Mix in ein Cellstar 15ml Falcon pipettiert und mittels *Pulse-Vortex* gemischt. Das SYBR Green Master Mix enthält den SYBR Green 1 Farbstoff, eine AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und optimierte Pufferkomponenten. 1900µl des *Master Mix* wurden zum *Primermix* pipettiert und erneut mittels *Pulse-Vortex* gemischt. Anschließend wurden 55,3µl dieser Lösung in jede der mit 2,7µl Patienten-DNA vorbereiteten 1,5 ml *Safe-lock Tubes* pipettiert, sodass jede *Tube* ein Volumen von 58µl enthielt. Aus jedem dieser *Tubes* wurden dann jeweils in zwei *Wells* einer Thermo-Fast 96 ABGene PCR Plate 25µl des Gesamtvolumens gegeben und die Platte mit einer Folie versiegelt.

Die fertige Platte wurde 2 Minuten bei 50°C inkubiert und dann für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase zu aktivieren. Dann folgt die Polymerase-Kettenreaktion in 40 Zyklen mit Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C), *Primer-Annealing* und Elongation (zusammen 1 Minute bei 60°C) wie in Abbildung 7 dargestellt. Anschließend wird das PCR-Produkt erneut bis auf 95°C erhitzt und denaturiert, nach 15 Sekunden wird das Amplifikat für 1 Minute auf 60°C abgekühlt. Dies dient einer regelrechten Interkalation des SYBR Green 1 Farbstoffs, gleichzeitig beginnt die Messung der Fluoreszenz des Farbstoffs. Es folgt nun die Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 7) mit einem Aufheizen des Geräts von 60°C auf 95°C mit einer Heizrate von 1%, entsprechend einem Temperaturanstieg von

0.025°C pro Sekunde. Während dieser Phase der Erhitzung kommt es zu einer Separierung der doppelsträngigen DNA. Solange der interkalierende Farbstoff SYBR Green an doppelsträngige DNA gebunden ist, fluoresziert er, wird die DNA durch Erhöhung der Temperatur denaturiert, kommt es zu einer Verminderung der Fluoreszenz.

Als Qualitätskontrolle der Schmelzkurvenanalyse dient die finale Abkühlung auf 60°C, wobei diese Temperatur über 15 Sekunden gehalten wird. Die nun gemessene Fluoreszenz wird mit dem Ausgangswert bei 60°C vor Beginn der Heizphase verglichen.

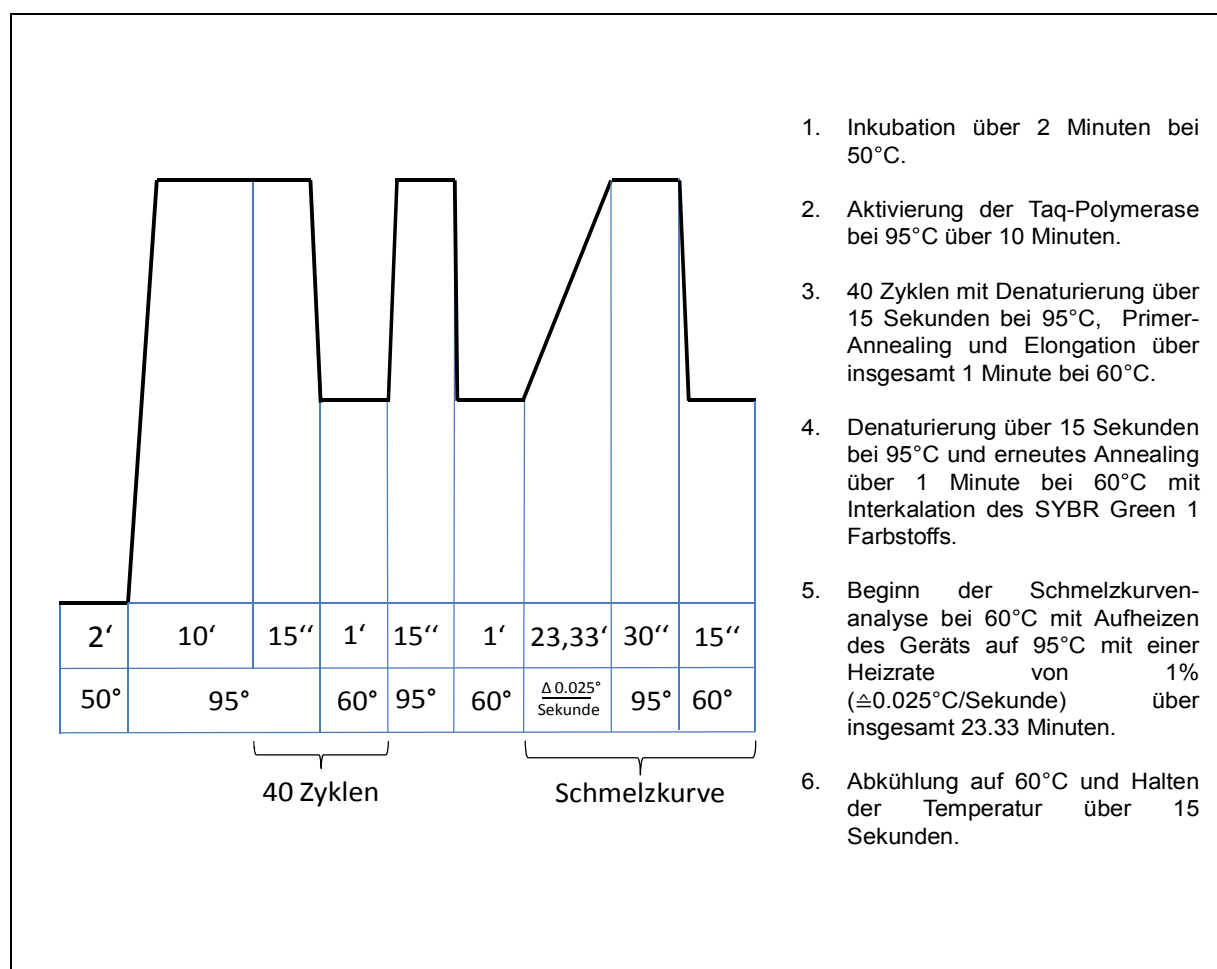


Abb. 7: Real-time PCR und Schmelzkurvenanalyse

Bei welcher Temperatur die DNA-Stränge der Amplifikate dissoziieren, ist abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren. So

sind Thymin und Adenin über zwei, Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Da es bei Vorliegen des V444A-Polymorphismus an der Stelle 1331 zu einem Austausch von Thymin zu Cytosin kommt, nimmt hier die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen zu und die DNA-Stränge dissoziieren erst bei höheren Temperaturen, so dass die Fluoreszenzabnahme von SYBR Green® im Vergleich zum V444A-Wildtyp später beobachtet wird.

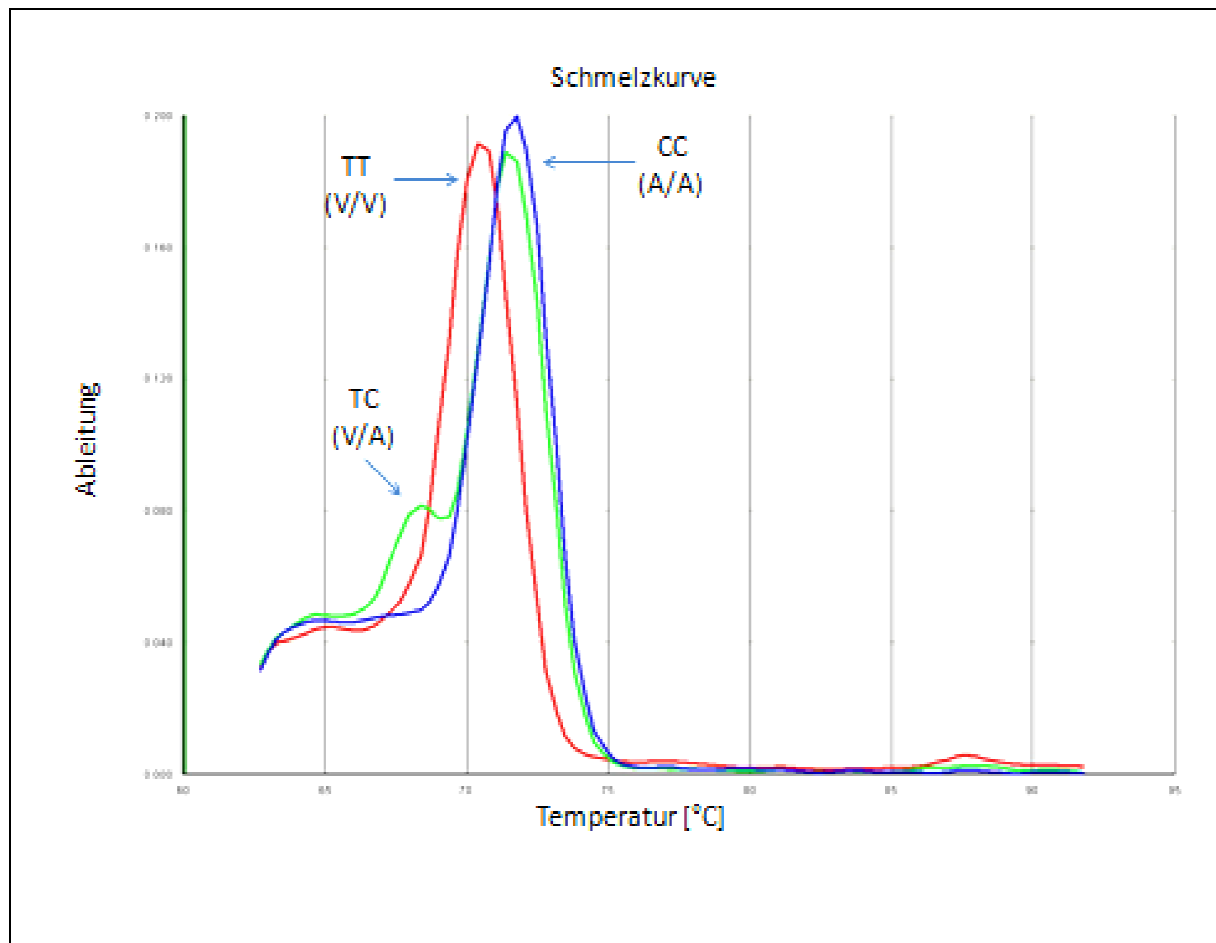


Abb. 8: Graphische Darstellung der Schmelzkurvenanalysen

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse werden graphisch dargestellt (Abbildung 8). Bei Homozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel zeigt die Schmelzkurve eine einzelne Spitze bei 71°C, bei Homozygotie für den V444A-Polymorphismus kann eine Spitze bei 72°C gezeigt werden. Heterozygote Proben weisen eine Schmelzkurve mit zwei Spitzen bei 68°C und bei 72°C auf.

3.5 Sequenzierung

Circa 25% der DNA konnten durch die Schmelzkurvenanalyse nicht eindeutig ausgewertet werden. Um eine Genotypisierung dieser Proben zu ermöglichen, wurde eine DNA-Sequenzierung vorgenommen.

Die Sequenzierung lief nach folgendem Schema ab:

1. PCR
2. Extraktion der DNA aus dem PCR-Amplifikat
3. DNA-Konzentrationsbestimmung
4. Sanger-Sequenzierung in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem ABI Prism® 3130XL Genetic Analyzer.

Der PCR-Ansatz für eine 2µl große DNA-Probe setzte sich wie folgt zusammen:

In ein Cellstar 15ml Falcon (Greiner bio-one) wurden 5µl 1-fach Coraload PCR Puffer (QIAGEN), 1,5µl dNTP PCR Nucleotide Mix 10mmol (Roche), 0,5µl Taq DNA Polymerase mit 5 IU/µl (QIAGEN), sowie jeweils 1,5µl des *Forward*- und *Reverse-Primerpaares* des *Primers* BSEP Exon 13 10pmol/µl (MWG) gegeben. Zu dieser Lösung wurden 38µl Aqua dest. gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 48µl resultierte, welches anschließend zu 2µl DNA in ein 1.5ml *Safe-lock Tube* (Eppendorf) pipettiert wurde.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt.

Zur Denaturierung der DNA wurde für 2 Minuten eine Temperatur von 94°C erzeugt. Anschließend folgte die Polymerase-Kettenreaktion in 35 Zyklen mit Denaturierung (0,5 Minuten bei 94°C), *Primer-Annealing* (0,5 Minuten bei 58°C) und Elongation (0,5

Minuten bei 72°C). Die finale Elongation fand über 10 Minuten bei 72°C statt. Dann wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt (Abbildung 9).

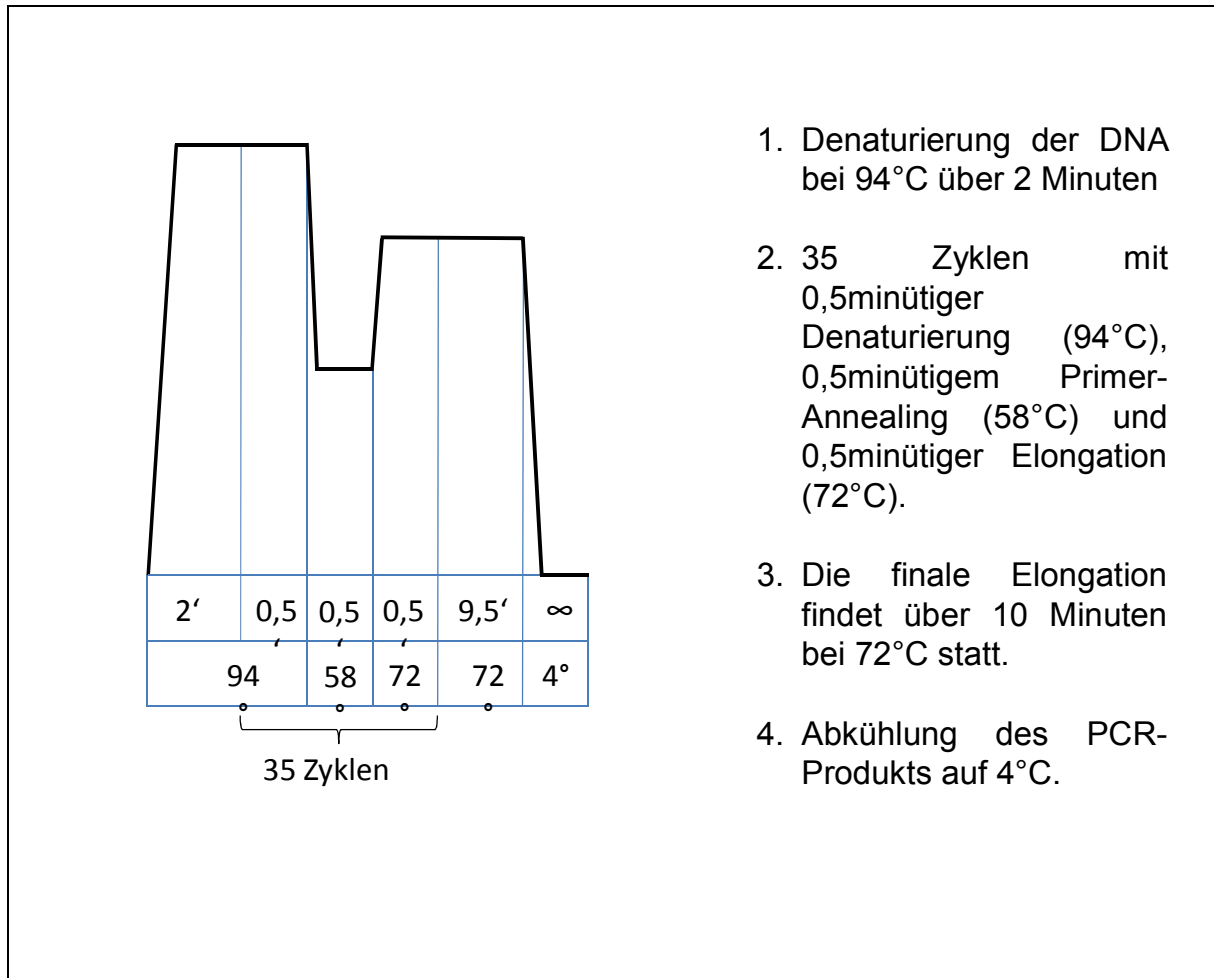


Abb. 9: Polymerase-Kettenreaktion zur Sequenzierung der DNA

Anschließend erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers eine Extraktion der DNA aus der PCR-Reaktion. Die gewonnene DNA-Menge wurde mit dem Spektralphotometer Nano-Drop ND1000 gemessen.

Für die Sequenzierung der DNA wurden 1,5µl des *Forward-Primers* BSEP Exon 13 10pmol/µl in ein *Well* einer Thermo-Fast 96 ABGene PCR Plate (Thermo Scientific)

pipettiert. Dann wurden in ein *Well* 10-15µg der zu analysierenden DNA-Proben appliziert und durch Hinzugeben von Aqua dest. wurde das Volumen auf insgesamt 7,5µl aufgefüllt. Die Sequenzierung wurde durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Anhand der Basen-Sequenzen konnte eine Bestimmung des V444A-Genotyps erfolgen.

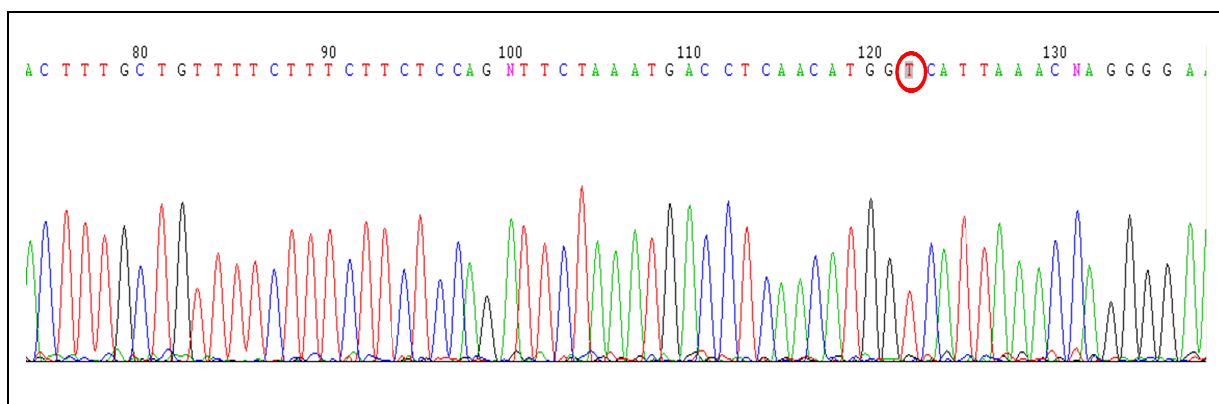


Abb. 10: Basen-Sequenz bei Homozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel

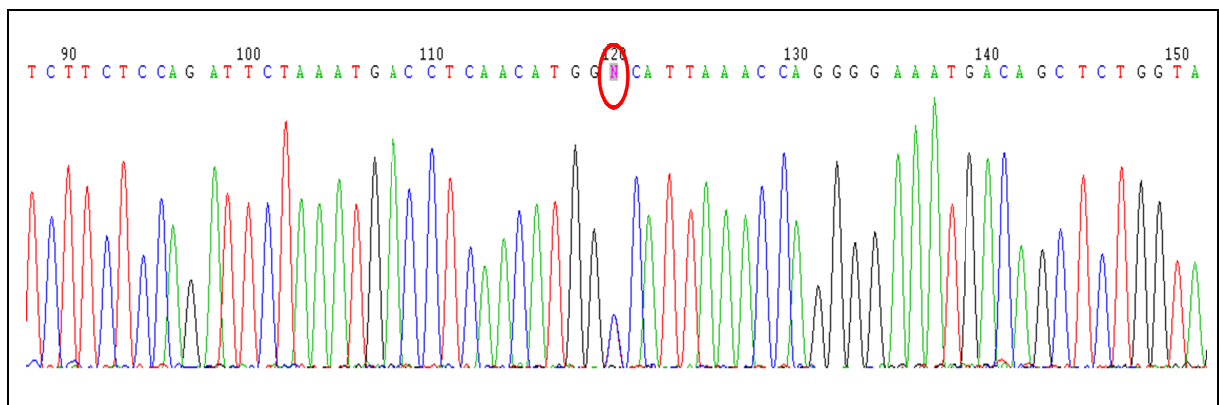


Abb. 11: Basen-Sequenz bei Heterozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel bzw. den Polymorphismus

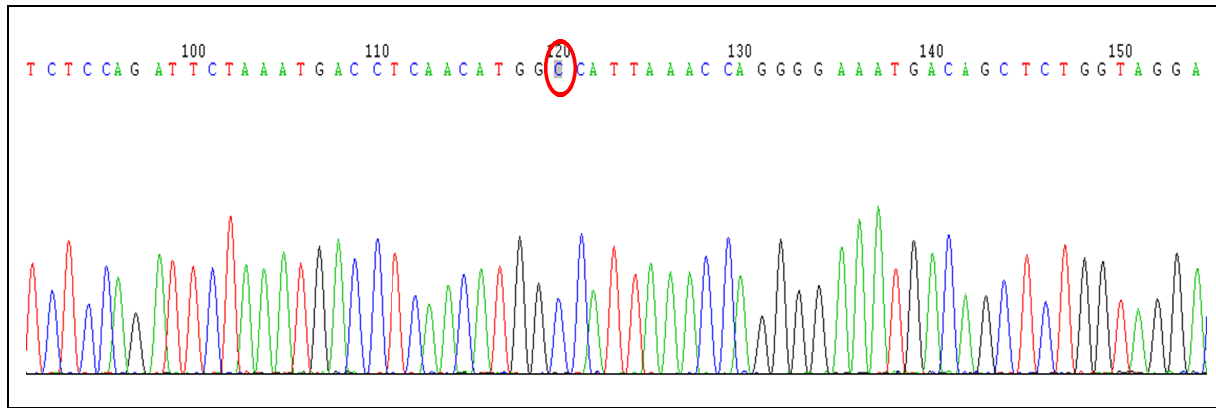


Abb. 12: Basen-Sequenz bei Homozygotie für den V444A-Polymorphismus

Die Basen-Sequenz des Wildtyp-Allels lautet CCTCAACATGGT CATTAAA mit einem Thymin an Position 1331 (Abbildung 10). Bei Heterozygotie für den V444A-Polymorphismus kommt es in der graphischen Darstellung der Sequenz zu einer Überlagerung des Cytosins mit dem Thymin, so dass die Sequenz als CCTCAACATGGN CATTAAA ausgegeben wird (Abbildung 11). Bei Homozygotie des Polymorphismus ist anstelle des Thymins auf beiden Allelen ein Cytosin nachweisbar, die Sequenz lautet dann CCTCAACATGGC CATTAAA (Abbildung 12).

Anhand dieser Sequenzierung ist bei Versagen der Schmelzkurvenanalyse eine eindeutige Genotypisierung möglich.

3.6 TaqMan® SNP Genotyping Assay

Ein TaqMan® SNP Genotyping Assay dient der Genotypisierungsanalyse, welche hier zur Bestimmung des IL28B-Genotyps der Patientenproben eingesetzt wurde. Der Assay läuft in zwei Schritten ab: zuerst wird eine Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation durchgeführt, anschließend erfolgt die Genotypisierung mittels Endpunktnachweis der Fluoreszenzsignale.

Ein vorgefertigter *Assay Mix* enthält die für die zu untersuchende Gensequenz spezifischen *Forward*- und *Reverse-Primer* zur DNA-Amplifizierung und zwei

TaqMan-MGB-Sonden. Jede dieser Sonden ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter am 5'-Ende gekoppelt, weiterhin enthält jede Sonde einen „*Minor Groove Binder*“ (MGB) zur Sonden-Stabilisierung durch Erhöhung der Schmelztemperatur und einen nicht-fluoreszierenden *Quencher* (NFQ) am 3'-Ende, der durch seine räumliche Nähe zum Reporterfarbstoff durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) dessen Fluoreszenz unterdrückt. Eine der beiden Sonden ist spezifisch für den Nachweis des G-Allels des IL28B-SNP („Allel 1“) konstruiert und mit dem Reporter-Farbstoff VIC® gekoppelt, die andere Sonde ist spezifisch für den Nachweis des T-Allels („Allel 2“) entworfen und mit dem Farbstoff FAM® verbunden. Die übrigen für die PCR benötigten Komponenten wie Pufferlösung, AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase und dNTPs sind im vorgefertigten SNP Genotyping Master Mix enthalten. Weiterhin enthält dieses Mix die AmpErase® Uracil-N-Glycosylase (UNG), ein rekombinantes Enzym, welches bei einem TaqMan® Assay die Reamplifikation von *Carryover*-Produkten aus vorangegangenen PCR-Reaktion unterbindet.

Die Genotypisierung der Patienten-Proben erfolgt nun nach folgendem Prinzip:

Während der PCR binden die Sonden zwischen den *Primern* an ihre spezifischen DNA-Komplementärsequenzen. Nach Bindung an die cDNA wird die Sonde durch die Taq-Polymerase gespalten. Hierbei kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporterfarbstoff und *Quencher*. Aufgrund der fehlenden Unterdrückung durch den *Quencher* nimmt das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes zu. Die Spaltung der Sonde durch die Taq-Polymerase ist jedoch nur möglich, wenn eine genaue Übereinstimmung zwischen den Allelsequenzen von cDNA und Sonde vorliegt und eine Hybridisierung stattfindet. Bei fehlender Übereinstimmung der Sequenzen wird die Sonde von der Taq-Polymerase ohne Spaltung aus der losen Bindung an die cDNA verdrängt. Da bei Homozygotie für das G- oder das T-Allel eine Übereinstimmung nur zwischen der cDNA-Sequenz und einer der beiden Sonden vorliegt, kommt es auch nur zur Freisetzung eines Farbstoffes, entweder VIC® oder FAM®. Liegt eine Heterozygotie vor, können beide Sonden die DNA-Komplementärsequenzen binden und beide Reporter-Farbstoffe werden abgespalten. Durch Detektion des entsprechenden Fluoreszenzsignals kann so eine Bestimmung des Genotyps erfolgen.

Der Ansatz des Master Mix für eine Probe setzt sich wie folgt zusammen:

12,5 µl SNP Genotyping Master Mix (2fach)

0,625 µl Assay Mix (40fach)

10,875 µl Aqua dest.

Das Gesamtvolumen des *Master Mix* für 1µl genomische DNA beträgt 24µl, so dass insgesamt ein Volumen von 25µl pro *Well* der Thermo-Fast 96 ABGene PCR Platte pipettiert wurde.

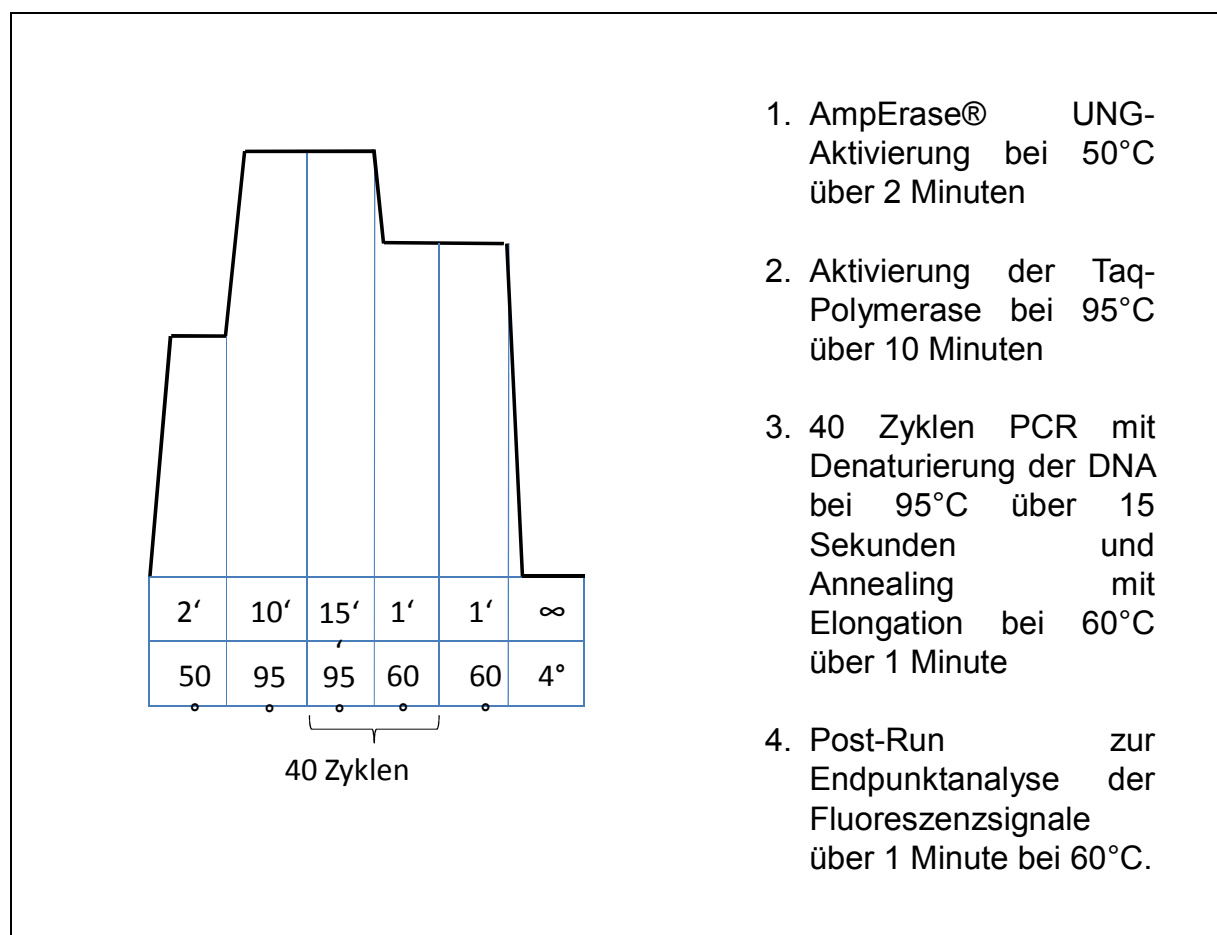


Abb. 13: **Protokoll der real-time PCR und Fluoreszenzanalyse für den TaqMan Assay** (Assay ID: C_11710096_10; Reference SNP Number: rs8099917)

Nachdem die AmpErase® Uracil-N-Glycosylase über 2 Minuten bei 50°C aktiviert wurde, folgte eine Aktivierung der AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase über 10 Minuten bei 95°C. Anschließend beginnt die Polymerase-Kettenreaktion mit insgesamt 40 Zyklen, die jeweils aus einer Denaturierungsphase bei 95°C über 15 Sekunden und einer *Annealing*- und Elongationsphase bei 60°C über insgesamt 1 Minute bestehen. Nach Beendigung des letzten PCR-Zyklus wird ein *Post-Run* über 1 Minute bei 60°C durchgeführt, wobei die Endpunktanalyse der Fluoreszenzsignale stattfindet (Abbildung 13).

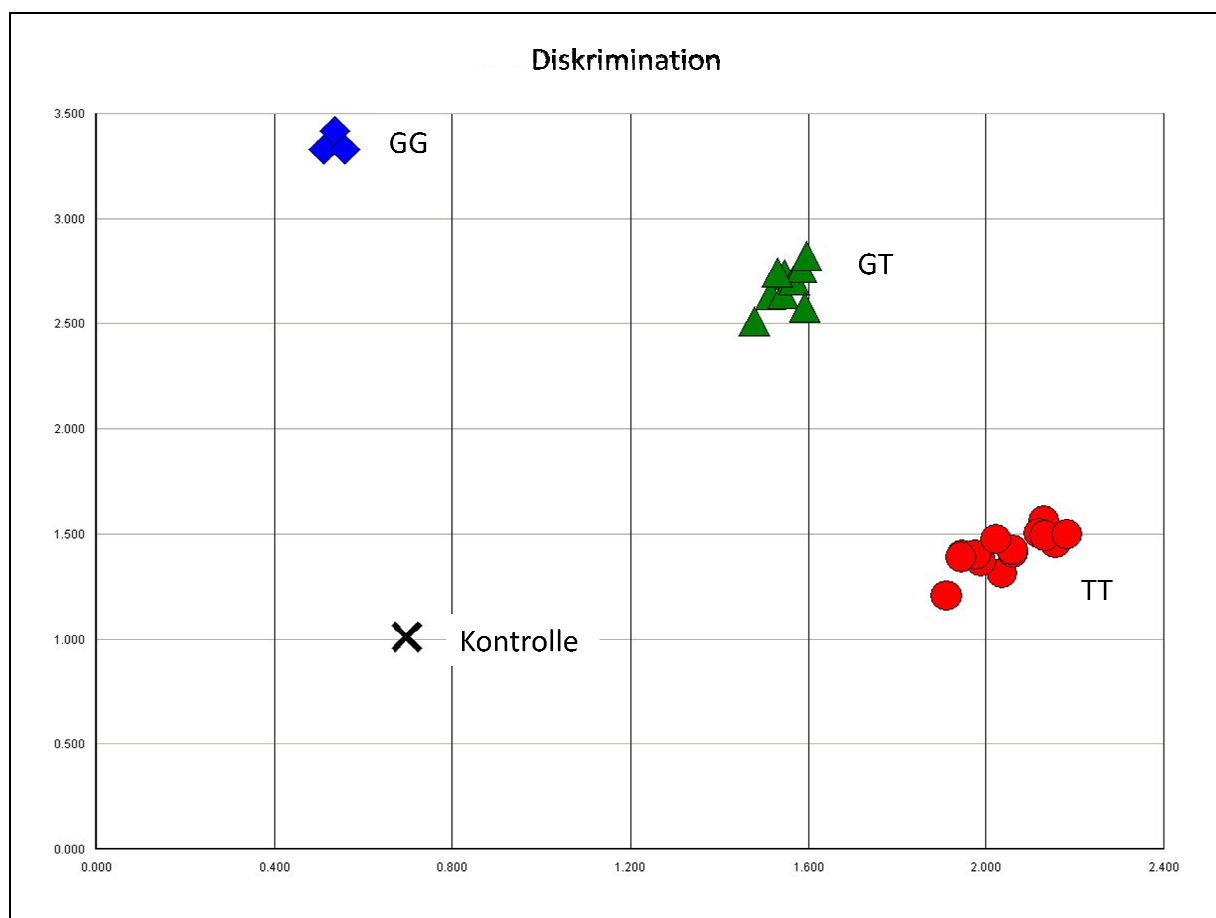


Abb. 14: Graphische Darstellung der Fluoreszenzanalysen

Anhand der graphischen Darstellung der Ergebnisse wie in Abbildung 14 konnte eine Bestimmung des IL28B-Genotyps des untersuchten Patienten erfolgen.

Mit Hilfe des spezifischen TaqMan® SNP Genotyping Assay war eine eindeutige Auswertung der untersuchten Proben möglich, so dass auf eine zusätzliche Sequenzierung der DNA verzichtet werden konnte.

3.7 Statistische Methoden

Um die Ergebnisse der DNA-Analyse, der V444A- und IL28B-Genotypisierung mit dem Therapieansprechen der Patienten zu korrelieren, wurde eine statistische Auswertung mit dem Programm SPSS Version 18 durchgeführt.

Als parametrische Tests zum Nachweis der Unabhängigkeit der untersuchten Patientengruppen und der Zugehörigkeit zu einer normalverteilten und homogenen Grundgesamtheit wurden der Levene -Test der Varianzgleichheit und der T-Test der Mittelwertgleichheit durchgeführt, zur Bestätigung der hier erhobenen Daten dienten als nichtparametrische Tests der Rangsummentest, der Mann-Whitney-U-Test und der Wilcoxon-W-Test.

Die statistische Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen Therapieerfolg, dem Geschlecht des Patienten, dem Genotyp des Hepatitis C-Virus, dem Therapeutikum und der individuellen Ausprägung des V444A-Polymorphismus erfolgte auf Grundlage der in der Studie beobachteten absoluten Häufigkeiten und der errechneten erwarteten Häufigkeiten anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson.

Nach dem deskriptiven Vergleich der Zusammenhänge zwischen dem V444A-Polymorphismus und dem Therapieerfolg mit den Zusammenhängen von weiteren unabhängigen Variablen (HCV-Genotyp, Geschlecht, Therapeutikum) mit dem Therapieerfolg, wurde durch Modellgütetests überprüft, ob der kausale Zusammenhang zwischen Vorhandensein von V444A-Polymorphismus und Therapieerfolg signifikant therapierelevant oder eher zufällig ist. Als entsprechende Tests dienen der Likelihood-Quotiententest mit dem Nullmodell, der Pseudo-R²-Koeffizient und die Wald-Statistik.

Die statistische Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen Therapieerfolg, dem Genotyp des Hepatitis C-Virus, dem V444A-Polymorphismus und dem Interleukin 28B-Polymorphismus existiert, erfolgte auf Grundlage der in der Studie beobachteten absoluten Häufigkeiten und der errechneten erwarteten Häufigkeiten anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson.

Die logistische Regression wurde zur Prüfung der relativen Wahrscheinlichkeit, mit der eine *Therapieresponse* in Abhängigkeit der jeweils unabhängigen Variablen IL28B- und V444A-Polymorphismus und HCV-Genotyp erreicht wird, durchgeführt. Die logistische Regression beinhaltet die Wald-Statistik zur Signifikanzprüfung des Regressionskoeffizienten.

Mit der anschließenden multivariaten Regression nach Cox wurden die Einflussgrößen der *Responsereaktionen* untersucht und die gemessenen Parameter wie Geschlecht und Alter der Patienten, Viruslast, HCV-Genotyp und Thrombozytenzahl als prognostischer Faktoren erfasst.

4. Ergebnisse und Auswertung der statistischen Ergebnisse

4.1.1 V444A-Polymorphismus

In der Hepatitisambulanz des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde von 254 Patienten eine Blutprobe entnommen und eine genetische Untersuchung zum Nachweis des V444A-Polymorphismus durchgeführt. Alle Patienten wurden zuvor ausführlich über diese Untersuchung und mögliche therapeutische Konsequenzen aufgeklärt.

Das Patientenkollektiv umfasst Patienten, die wegen einer chronischen Hepatitis-C-Infektion in der Vergangenheit antiviral therapiert wurden oder die zum Zeitpunkt der Blutabnahme unter Behandlung standen. Die klinischen und biochemischen Parameter der Patienten wurden zu Beginn des Behandlungsverlaufs und zu zeitlich festgesetzten Nachkontrollen während und nach der Therapie tabellarisch dokumentiert. Diese Parameter umfassen den HCV – Genotyp, die Viruskinetik unter der Interferon-Behandlung, die Transaminasen, den Bilirubinwert, die Cholestaseparameter Alkalische Phosphatase und gamma-GT, die Laktatdehydrogenase, die Eiweiß-Elektrophorese, Cholesterin und Triglyzeride, den Quick-Wert und das Blutbild mit Werten für Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten. Gemessen wurden diese Parameter initial vor Therapieeinleitung, drei und sechs Monate nach Therapiebeginn, bei Beendigung (ETR) sowie sechs Monate nach Beendigung der Therapie (SVR).

Insgesamt erfüllten 200 Patienten alle Kriterien, die für eine Analyse der Daten als Voraussetzung gelten. Diese Kriterien beinhalten eine vollständige Dokumentation des Therapieverlaufs, einheitliche und vergleichbare Tests zur Bestimmung der einzelnen Parameter und eine vergleichbare medikamentöse Behandlung. Es wurden alle Patienten entweder mit 180µg pegylierten Interferon alpha-2a oder mit 1,5µg pro Kilogramm Körpergewicht pegyliertem Interferon alpha-2b jeweils in

Kombination mit Ribavirin behandelt. Hierbei erfolgte die Interferon-Applikation einmal wöchentlich, Ribavirin wurde täglich eingenommen. Patienten, die mit Standard-Interferon in Kombination mit Ribavirin behandelt wurden, erhielten Interferon drei Mal pro Woche.

4.1.2 Statistische Auswertung der Messungen

4.1.2.1 Parametrische Tests

Die vor Therapiebeginn erhobenen biochemischen Parameter dienen als Indikatoren für gleiche Ausgangsbedingungen. Diese müssen gegeben sein, damit eine statistische Auswertung und eine qualitative Interpretation der Ergebnisse möglich ist. Aus diesem Grund muss getestet werden, ob die beobachteten Patienten einer Gruppe zuzuordnen sind und über normalverteilte Daten charakterisiert werden können. Weiterhin muss geprüft werden, ob die Unabhängigkeit der Stichproben trotz der Differenzierung in die Untergruppen der Merkmalsträger „V444A homozygot Wildtyp“ und „V444A homozygot / heterozygot SNP“ bestehen bleibt und eine Vergleichbarkeit der Gruppen gewährleistet ist. Zum Testen der Grundbedingungen dienen die biochemischen Parameter GOT, GPT, gamma-GT und Thrombozyten. Die statistische Signifikanz wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ angenommen. Die Kodierung der Patientendaten erfolgt so, dass Teilnehmer, die bezüglich des V444A-Polymorphismus homozygot für das Wildtypallel sind, im Folgenden als „V444Awt 1“ klassifiziert werden und dass diejenigen, die homozygot oder heterozygot für den Polymorphismus sind, unter „V444Awt 0“ zusammengefasst werden.

In Tabelle 1 wird geprüft, ob die Nullhypothese, dass bei homogenen und normalverteilten Datenmengen in vergleichbaren Gruppen die Mittelwerte der beobachteten Parameter gleich sind, gültig ist. Der Vergleich der Mittelwerte zeigt, dass die Nullhypothese bestätigt werden kann. Die Standardabweichungen differieren wegen unterschiedlich großer Stichprobenmengen.

Patientenkollektiv, Mittelwert					
--------------------------------	--	--	--	--	--

Parameter	V444Awt	N	Mittelwert	Standard- Abweichung	Standardfehler des Mittelwerts
GOT	1	29	72,6	103,736	19,236
	0	129	65,2	53,190	4,683
GPT	1	29	100,0	80,902	15,023
	0	129	100,4	100,752	8,855
gamma-GT	1	29	57,1	64,392	11,957
	0	129	58,9	49,017	4,317
Thrombozyten	1	29	206,1	78,490	14,833
	0	129	205,9	69,684	6,159

Tabelle 1: Übersicht des Patientenkollektivs und der Mittelwerte der untersuchten Variablen. gamma-GT = Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT = Glutamat Oxalat Transferase; GPT = Glutamat Pyruvat Transferase; N = Stichprobenumfang; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP.

Der Levene-Test (Tabelle 2) überprüft die Nullhypothese, die besagt, dass die Varianzen in der Grundgesamtheit gleich sind. Die Signifikanz p gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der beim Ablehnen der Nullhypothese ein Fehler begangen wird. Die hohen p-Werte deuten darauf hin, dass die gefundenen Varianzen der Grundgesamtheit tatsächlich entsprechen können. Die Nullhypothese darf aus diesem Grund nicht abgelehnt werden.

Levene-Test der Varianzgleichheit			
-----------------------------------	--	--	--

		F	Signifikanz
GOT	Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	1,823	0,179
GPT	Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	0,129	0,720
gamma-GT	Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	0,111	0,740
Thrombozyten	Varianzen sind gleich Varianzen sind nicht gleich	0,344	0,559

Tabelle 2: Der Levene-Test zur Untersuchung der Varianzgleichheit zeigt, dass eine Normalverteilung der Datenwerte vorliegt. gamma-GT = Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT = Glutamat Oxalat Transferase; GPT = Glutamat Pyruvat Transferase; F = F-Wert.

Gleiche Varianzen sind sämtlich mit einer Signifikanz von größer als $p=0.05$ ausgewiesen, die Nullhypothese darf deshalb hier nicht zurückgewiesen werden. Es gilt: je höher die Signifikanzwerte sind, umso eher ist von einer Normalverteilung der Datenwerte auszugehen, denn berechnet wird die Wahrscheinlichkeit, mit der das Zurückweisen der Nullhypothese falsch ist.

Die Nullhypothese des T-Tests für unabhängige Stichproben (Tabelle 3) fordert, dass der Unterschied der Mittelwerte der einzelnen Parameter der Gruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ gleich Null ist. Die Nullhypothese erweist sich hier als wahr: Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (71,3% für GOT, 98,0% für GPT, 89,0% für gamma-GT und 98,9% für Thrombozyten) kann sich der T-Wert von nahezu 0 ergeben. Die Annahme der Nullhypothese stützt die Annahme der Unabhängigkeit der einzelnen Stichproben. Eine Verzerrung durch die bewusst gewählte Differenzierung in die Kategorien „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ liegt nicht vor.

T-Test für die Mittelwertgleichheit								
	Varianzen	T	Df	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standard- fehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
							Unterer Wert	Oberer Wert
GOT	sind gleich	0,549	156	0,584	7,354	13,402	-19,119	33,27
	sind nicht gleich	0,371	31,384	0,713	7,354	19,824	-33,058	47,766
GPT	sind gleich	-0,022	156	0,983	-0,434	20,003	-39,946	39,078
	sind nicht gleich	-0,025	49,527	0,980	-0,434	17,438	-35,469	34,600
gamma-GT	sind gleich	-0,166	156	0,869	-1,773	10,709	-22,928	19,381
	sind nicht gleich	-0,139	35,638	0,890	-1,773	12,712	-27,564	24,018
Thrombozyten	sind gleich	0,015	156	0,988	0,217	14,877	-29,172	29,605
	sind nicht gleich	0,013	36,880	0,989	0,217	16,061	-32,330	32,763

Tabelle 3: Der T-Test zeigt, dass die Patientengruppen unabhängig voneinander sind und einer normalverteilten und homogenen Grundgesamtheit angehören. Df = Freiheitsgrade, gamma-GT = Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT = Glutamat Oxalat Transferase; GPT = Glutamat Pyruvat Transferase; T = T-Wert.

Um einen Anhaltspunkt darüber zu bekommen, ob die Mittelwertdifferenzen in der Grundgesamtheit genauso groß sind wie in der Stichprobe, liefert die SPSS-Software

die Ergebnisse des T-Tests mit Standardfehler der Differenzen und dem 95%igen Konfidenzintervall für den Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen. In der Tabelle lässt sich ablesen, dass die Differenz der Mittelwerte mit 95%iger Wahrscheinlichkeit in sehr engen Grenzen liegt und die Streubreite um den Mittelwert sehr gering ist.

Zusammenfassung:

Mit den Ergebnissen des T-Tests kann hier gezeigt werden, dass die untersuchten Patientengruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ unabhängig voneinander sind und einer normalverteilten und homogenen Grundgesamtheit angehören.

4.1.2.2 Nichtparametrische Tests, Rangsummentests

Um weitere Kriterien einer Normalverteilung zu gewinnen, wurde im Sinne einer explorativen Datenanalyse eine Rangvarianzanalyse durchgeführt. Ziel dieses alternativen Tests ist es auch hier auszuschließen, dass die erhobenen Datenwerte nicht normalverteilt sind. Die Testvariablen GOT, GPT, gamma-GT und Thrombozyten werden auf Unterschiede zwischen den Stichprobengruppen getestet. Gleichzeitig werden die Gruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ miteinander verglichen. Dazu werden alle Daten der jeweiligen Testvariable aus beiden Gruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ in eine gemeinsame größensortierte Rangordnung gebracht. Als Nullhypothese wird definiert: Für jede empirische Beobachtung ist jeder Rang gleich wahrscheinlich. Dies impliziert, dass keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ hinsichtlich der Variablenwerte bestehen. Bei Gültigkeit der Nullhypothese sollten die beiden Gruppen in der zu Beginn gebildeten Reihenfolge gleichmäßig verteilt sein. Die Rangsummen R_0 und R_1 sollten demnach annäherungsweise die gleiche Größe haben. Sofern diese Kriterien erfüllt werden, kann die Nullhypothese angenommen werden und von einer Normalverteilung der Datenwerte ist auszugehen.

Rangsummentest

Parameter	V444Awt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme T
GOT	0	129	80,07	10329,00
	1	29	76,97	2232,00
Gesamt		158		
GPT	0	129	78,83	10169,00
	1	29	82,48	2392,00
Gesamt		158		
gamma-GT	0	129	80,64	10402,00
	1	29	74,45	2159,00
gesamt		158		
Thrombozyten	0	129	78,28	10020,00
	1	29	79,50	2226,00
Gesamt		158		

Tabelle 4: Bestimmung der Rangsummen und der mittleren Ränge der einzelnen Variablen innerhalb der Gruppen V444Awt 0 und 1. gamma-GT = Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT = Glutamat Oxalat Transferase; GPT = Glutamat Pyruvat Transferase; N = Stichprobenumfang; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP.

Bei einem Vergleich der mittleren Ränge (Tabelle 4) fällt auf, dass zum Beispiel für die Gruppe „V444Awt 0“ der mittlere Rangwert für die GPT bei 78,83 liegt, für die Gruppe „V444Awt 1“ jedoch bei 82,48. Die Gruppe „V444Awt 0“ weist damit insgesamt niedrigere GPT-Werte auf als die Gruppe „V444Awt 1“.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede der mittleren Ränge signifikant sind, wird der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (Tabelle 5). Weil für die Berechnung der Signifikanz eine ausreichend große Stichprobe vorliegen muss, wird, um eine größere Sicherheit zu haben, zusätzlich die exakte Signifikanz berechnet.

Die U-Werte im Mann-Whitney-Test werden aus den Stichprobengröße N_0 , N_1 und der Rangsumme T (Tabelle 4) nach der Formel $U = N_0 \times N_1 + \frac{N_0 \times (N_0 + 1)}{2} - T_0$, beziehungsweise nach der Formel $U' = N_0 \times N_1 - U$ berechnet. Anhand der Werte aus Tabelle 4 ergibt sich z. B. für die Testvariable GOT ein U-Wert von 1797,00 und ein U'-Wert von 1944,00. Die im Folgenden weiter zu benutzende Prüfgröße ist die mit dem geringeren Wert, hier also U da $U < U'$ (vgl. Tabelle 5). Bei kleinen Stichproben folgt nun der Vergleich der Prüfgröße mit dem sogenannten kritischen U-Wert. Da hier aber eine große Stichprobe mit $N_0=129$ vorliegt muss U zu einer

asymptotisch normalverteilten Größe, dem Z-Wert, standardisiert werden (Tabelle 5). Bei einem absoluten Z-Wert oberhalb des kritischen Z-Wertes von 1,96 wäre von einem signifikanten Unterschied der Verteilung der untersuchten Parameter innerhalb der Stichproben auszugehen und die Nullhypothese wäre abzulehnen.

Mann-Whitney-U-Test				
	GOT	GPT	gamma-GT	Thrombozyten
Mann-Whitney U	1797,00	17884,00	1723,00	1764,00
Z-Wert	-0,330	-0,389	-0,658	-0,129
Asymptot. Signifikanz (2-seitig)	0,741	0,698	0,510	0,897
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,743	0,700	0,513	0,897
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,372	0,350	0,257	0,499

Tabelle 5: Der Mann-Whitney-U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen V444Awt 0 und 1 hinsichtlich der untersuchten Testvariablen. gamma-GT = Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT = Glutamat Oxalat Transferase; GPT = Glutamat Pyruvat Transferase.

Da alle hier errechneten Z-Werte $< 1,96$ sind und sich hier ein Ergebnis wie bei dem parametrischen T-Test ergibt und die Signifikanz sämtlicher Prüfwerte größer als das festgelegte Signifikanzniveau von $p=0.05$ ist, kann konstatiert werden, dass die Nullhypothese verifiziert ist: Es gibt somit keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „V444Awt 1“ und „V444Awt 0“ hinsichtlich der untersuchten Laborparameter.

Zusammenfassung:

Die erhobenen Datenwerte erfüllen die Voraussetzungen für weitere Tests für unabhängige Stichproben.

4.1.2.3 Zusammenhangstests

Im Weiteren soll statistisch überprüft werden, ob es einen Zusammenhang gibt zwischen Therapieerfolg (ETR, SVR, *Relapse*), dem Geschlecht des Patienten (*Gender*), dem Genotyp des Hepatitis C-Virus (HCV1/4), dem Therapeutikum (Pegifn) und der individuellen Ausprägung des V444A-Polymorphismus („V444Awt 0“ beziehungsweise „V444Awt 1“). Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 infiziert sind, werden als „HCV1/4 1“ zusammengefasst, Patienten mit dem HCV-Genotyp 2 oder 3 als „HCV1/4 0“. Die Gruppe „Pegifn 1“ umfasst diejenigen Patienten, die mit pegyliertem Interferon in Kombination mit Ribavirin behandelt wurden, „Pegifn 0“ umfasst Patienten, die mit Standard-Interferon in Kombination mit Ribavirin therapiert wurden.

Verarbeitete Fälle für Zusammenhangstests						
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Gender * V444Awt	196	98,0%	4	2,0%	200	100%
HCV1/4 * V444Awt	175	87,5%	25	12,5%	200	100%
Pegifn * V444Awt	167	83,5%	33	16,5%	200	100%
ETR * V444Awt	196	98,0%	4	2,0%	200	100%
SVR * V444Awt	196	98,0%	4	2,0%	200	100%
Relapse * V444Awt	196	98,0%	4	2,0%	200	100%

Tabelle 6: Übersicht über die verarbeiteten Fälle für die Zusammenhangstests. ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); *Gender* = Geschlecht; HCV1/4 = Genotyp 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Pegifn = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; N = Stichprobenumfang; *Relapse* = Erneut nachweisbare HCV-RNA nach ETR oder SVR; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Die Nullhypothese, die verifiziert werden soll, fordert hier, dass es keinen Zusammenhang zwischen den Variablen gibt. Es wird untersucht, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese verifiziert wird. In der Forschungshypothese ist

formuliert, dass die unabhängige Variable „V444Awt 1“ mit den abhängigen Variablen ETR, SVR und *Relapse* korreliert ist, der V444A–Polymorphismus demnach den Therapieerfolg beeinflusst. Die Tabelle 6 „Verarbeitete Fälle“ fasst die für die Forschungsarbeit erhobenen Patientendaten zusammen. Die Verknüpfung von zwei Variablen innerhalb dieser Tabelle (z. B. *Gender* * V444A) zeigt an, bei welcher Anzahl von Patienten beide Variablen eindeutig zu bestimmen waren.

Ein statistisch wahrscheinlicher Zusammenhang zwischen den Variablen und „V444Awt 0“ beziehungsweise „V444Awt 1“ kann in den Kreuztabellen und Chi-Quadrat Tests dargestellt werden. Hier gilt bei einer ungerichteten Alternativ- bzw. Forschungshypothese für einen zweiseitigen Chi-Quadrat-Test mit einem Freiheitsgrad bei dem festgelegten Signifikanzniveau von $p=0.05$ der kritische Chi-Quadrat-Wert von 3,84. Liegt der errechnete Chi-Quadrat oberhalb dieses kritischen Wertes wird die Nullhypothese verworfen und die Forschungshypothese angenommen. Mit Hilfe von Kreuztabellen wird die gemessene absolute Häufigkeit verglichen mit der erwarteten Häufigkeit der einzelnen Parameter in Korrelation mit dem V444A-Polymorphismus „V444Awt 0“ und „V444Awt 1“. Unter der Annahme der Unabhängigkeit der beiden Variablen werden die erwarteten Häufigkeiten errechnet. Erwartete Häufigkeiten sind Werte, die sich ergeben, wenn die beiden betrachteten Variablen unabhängig voneinander wären.

Tabelle 7 zeigt, dass die Nullhypothese der Unabhängigkeit bestätigt werden kann, da die Differenzen zwischen absoluten und erwarteten Häufigkeiten für alle Variablen sehr niedrig sind und zum Teil sogar Null ergeben.

Die Chi-Quadrat Werte (Tabelle 8) sind analog zu den sehr niedrigen Differenzen zwischen absoluten und erwarteten Häufigkeiten sehr niedrig und geben mit hoher statistischer Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit < 0.05) an, dass die Nullhypothese bestätigt wird. Die untersuchten Variablen Geschlecht (*Gender*), der HCV-Genotyp (HCV1/4), das Therapeutikum (Pegifn) und der V444A-Polymorphismus („V444Awt 0“ und „V444Awt 1“) sind nicht miteinander korreliert. Es gibt keinen Zusammenhang.

Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich Geschlecht, HCV-Genotyp und Interferontherapie

			V444Awt 0	V444Awt 1	Gesamt
Gender	0	absolute Häufigkeit	71	16	87
		erwartete Häufigkeit	71	16	
	1	absolute Häufigkeit	89	16	109
		erwartete Häufigkeit	89	16	
	Gesamt		160	36	196
HCV1/4	0	absolute Häufigkeit	31	3	34
		erwartete Häufigkeit	28	6	
	1	absolute Häufigkeit	113	28	141
		erwartete Häufigkeit	116	25	
	Gesamt		144	31	175
Pegifn	0	absolute Häufigkeit	15	2	17
		erwartete Häufigkeit	14	3	
	1	absolute Häufigkeit	123	27	150
		erwartete Häufigkeit	124	26	
	Gesamt		138	29	167

Tabelle 7: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich Geschlecht, HCV-Genotyp und Interferontherapie. *Gender* 0 = weibliches Geschlecht; *Gender* 1 = männliches Geschlecht; HCV1/4 0 = Vorliegen des Genotyps 2 oder 3 des Hepatitis C-Virus; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Pegifn 0 = Behandlung mit Standard-Interferon; Pegifn 1 = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des V444A-Polymorphismus mit Geschlecht, HCV-Genotyp und Interferontherapie

	Gender * V444Awt	HCV1/4 * V444Awt	Pegifn * V444Awt
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	0,000	2,288	0,414
Freiheitsgrade (Df)	1	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,994	0,130	0,520
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	0,144	0,740
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,569	0,099	0,403

Tabelle 8: Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Die untersuchten Variablen Geschlecht, HCV-Genotyp, das Therapeutikum und der V444A-Polymorphismus sind nicht miteinander korreliert. Df = Freiheitsgrade; *Gender* = Geschlecht; HCV1/4 = Genotyp 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Pegifn = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; V444Awt = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Das Therapieansprechen von Patienten, die entweder homozygot für das V444A-Wildtyp-Allel sind oder dieses Allel nicht beziehungsweise heterozygot tragen, wird ebenfalls über Kreuztabellen beurteilt:

Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens					
			V444Awt 0	V444Awt 1	Gesamt
ETR	0	absolute Häufigkeit	51	8	59
		erwartete Häufigkeit	48	11	
	1	absolute Häufigkeit	109	28	137
		erwartete Häufigkeit	112	25	
	Gesamt		160	36	196
SVR	0	absolute Häufigkeit	93	13	106
		erwartete Häufigkeit	86	19	
	1	absolute Häufigkeit	67	23	90
		erwartete Häufigkeit	74	17	
	Gesamt		160	36	196
Relapse	0	absolute Häufigkeit	118	31	149
		erwartete Häufigkeit	122	27	
	1	absolute Häufigkeit	42	5	47
		erwartete Häufigkeit	38	9	
	Gesamt		160	36	196

Tabelle 9: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens. ETR 0 = kein Erreichen einer *End of Treatment-Response* (keine negative HCV-RNA bei Therapieende); ETR 1 = Erreichen einer *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); *Relapse* 0 = keine erneut nachweisbare HCV-RNA nach ETR oder SVR; *Relapse* 1 = Erneut nachweisbare HCV-RNA nach ETR oder SVR; SVR 0 = kein Erreichen einer *Sustained Virological Response* (kein dauerhaftes Therapieansprechen, positive HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); SVR 1 = Erreichen einer *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Die gerundeten Werte der erwarteten Häufigkeiten sind zur SPSS-Tabelle hinzugefügt worden. Auf der Basis der Häufigkeitsdifferenzen ergibt sich der Chi-Quadrat-Test nach Pearson (Tabelle 10) mit folgenden Signifikanzwerten:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson – Korrelation des V444A-Polymorphismus mit dem Therapieansprechen

	ETR	SVR	Relapse
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	1,301	5,735	2,436
Freiheitsgrade (Df)	1	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,254	0,017	0,117
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,317	0,025	0,135
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,174	0,014	0,084

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem V444A-Polymorphismus und einer SVR. Df = Freiheitsgrade; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); *Relapse* = Erneut nachweisbare HCV-RNA nach ETR oder SVR; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende).

Die Nullhypothese, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen und dem V444A-Polymorphismus gibt, kann mit dem Chi – Quadrat Tests im Falle von ETR und *Relapse* verifiziert werden. Die asymptotische Signifikanz und die exakte Signifikanz sind größer als $p=0,05$. Die exakte Signifikanz wurde zusätzlich ermittelt, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse trotz eventueller Verletzung der Voraussetzungen des Chi-Quadrat Tests glaubwürdig sind.

Eine unabhängige Verteilung der Parameter muss aber im Fall der SVR angezweifelt werden. Der Chi-Quadrat-Wert liegt mit 5,735 oberhalb des kritischen Chi-Quadrat-Wertes von 3,84 in einem Wertebereich, der die Nullhypothese falsifiziert. Es ist davon auszugehen, dass das dauerhafte Therapieansprechen (SVR) in engem Zusammenhang mit dem V444A-Polymorphismus steht.

Zusammenfassung:

Das Ergebnis der Zusammenhangstests lässt sich so formulieren, dass eine Assoziation zwischen dem V444A-Wildtyp-Allel (V444Awt 1) und dem Therapieansprechen (SVR) besteht. Eine Verifizierung der Forschungshypothese wird statistisch erreicht. Merkmale wie Geschlecht, Virusgenotyp und eingesetzte

Therapeutika stehen nicht in Abhängigkeit zur Ausprägung des V444A-Polymorphismus.

Die Zusammenhangstests legen nahe, dass Patienten nach einer antiviralen Therapie häufiger ein SVR erreichen, wenn sie homozygot für den V444A-Wildtyp sind. Der Therapieerfolg wird beeinflusst von der Ausprägung des V444A-Polymorphismus.

4.1.2.4 Modellgütetests

Nachdem deskriptiv verglichen wurde, ob sowohl zwischen dem V444A-Polymorphismus und dem Therapieerfolg, als auch zwischen den weiteren unabhängigen Variablen (HCV1/4, Peginf, *Gender*) und dem Therapieerfolg ein Zusammenhang besteht, soll im Rahmen eines Modellgütetests überprüft werden, ob der nachgewiesene Zusammenhang zwischen V444A-Polymorphismus und Therapieerfolg signifikant therapierelevant oder eher zufällig ist. Wenn dieses Modell der jeweiligen Verknüpfungen statistische Signifikanz zeigt, bedeutet dies eine kausale Relevanz des V444A-Polymorphismus für das Eintreten des Therapieerfolgs. In diesem Fall bestätigt das Modell die Hypothese und ist eine Erklärung für das bessere Ansprechen auf die Therapie bei Patienten mit Homozygotie für den Wildtyp des V444A-Polymorphismus.

Die „Güte“ des Modells wird mit dem SPSS-Programm „Nominale logistische Regression“ analysiert. Die Voraussetzung der Gütetests ist, dass keine linearen Beziehungen zwischen den unabhängigen Variablen bestehen, was bereits zuvor gezeigt werden konnte, und dass die Stichproben ausreichend groß sind.

Weil das Programm SPSS nicht mit Individualdaten rechnet, sondern mit aggregierten Daten, werden diese in der Tabelle 11 „verarbeitete Fälle“ in einer Häufigkeitsauszählung aufgelistet. Da für diese Analyse alle unabhängigen Variablen erfasst sein müssen, können insgesamt 152 Fälle in diese Untersuchung aufgenommen werden. Bei den fehlenden 48 Fällen konnte mindestens eine unabhängige Variable nicht bestimmt werden.

Verarbeitete Fälle für Modellgütetests

		Anzahl	Rand-Prozentsatz
SVR	0	73	48,0%
	1	79	52,0%
HCV1/4	0	31	20,4%
	1	121	79,6%
Peginf	0	16	10,5%
	1	136	89,5%
Gender	0	70	46,1%
	1	82	53,9%
V444Awt	0	126	82,9%
	1	26	17,1%
Gültig		152	100%
Fehlend		48	
Gesamt		200	
Teilgesamt		11	

Tabelle 11: Darstellung der verarbeiteten Fälle für die Modellgütetests. *Gender* = Geschlecht; HCV1/4 = Genotyp 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Peginf = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; N = Stichprobenumfang; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Mit dem Modellgütetest wird der Frage nachgegangen, ob das Forschungsmodell mit seinen Resultaten des erfolgreichen Therapieansprechens einen tatsächlichen Erklärungswert für dieses Therapieansprechen liefert. Ist das Modell also eine Anpassung an die wahren kausalen Zusammenhänge?

Um die Anpassung zu testen, wird das Forschungsmodell („endgültiges Modell“) mit einem „Nullmodell“ verglichen (Tabelle 12). Das Nullmodell beinhaltet nur die Konstante der Regressionsgleichung als unabhängige Variable und die tatsächlichen unabhängigen Prädiktoren werden nicht berücksichtigt. Die Nullhypothese postuliert die Bedeutungslosigkeit aller im Modell spezifizierten Effekte (Zusammenhänge). Der Likelihood-Test überprüft die Signifikanz des logistischen Gesamtmodells, deshalb sind 4 Freiheitsgrade berücksichtigt, einer für jede Prädiktoren-Variable.

„Nullmodell“, Likelihood – Quotiententest
--

Modell	Kriterien für die Modellanpassung			
	-2 Log-Likelihood	Chi- Quadrat	Freiheitsgrade (Df)	Signifikanz
Nur konstanter Term	54,510			
Endgültig	26,749	27,761	4	0,000

Tabelle 12: Das Nullmodell zeigt: Die Nullhypothese, nach der die untersuchten Variablen keinen Einfluss auf das Therapieansprechen haben ist zu verwerfen. Df = Freiheitsgrade.

Der deutlich niedrigere -2 Log-Likelihood-Wert des endgültigen Modells im Vergleich zum -2 Log-Likelihood-Wert des Nullmodells deutet eine Verminderung der Varianzen an und lässt die Interpretation zu, dass im hypothetischen Nullmodell die Veränderungen des Therapieansprechens nicht erklärt werden können. Auch ist die Differenz der von der SPSS-Software errechneten Werte des Nullmodells und des vollständigen endgültigen Modells sehr groß, so dass sich ein hoher Erklärungsanteil der untersuchten Variablen ableiten lässt. Mit dem Chi-Quadrat-Wert wird eine Aussage über die Signifikanz der Differenzen der -2 Log-Likelihood-Werte gemacht. Der Chi-Quadrat-Wert von 27,761 ist bei 4 Freiheitsgraden deutlich größer als der kritische Chi-Quadrat-Wert von 9,49 und belegt somit einen hoch signifikanten Einfluss der Prädiktoren.

Mit dem Nullmodell kann kein kausaler Zusammenhang der unabhängigen Variablen und des Therapieansprechens erklärt werden. Die Nullhypothese, nach der die untersuchten Variablen keinen Einfluss auf das Therapieansprechen haben ist zu verwerfen.

Die Evaluation des Gesamtmodells zeigt in der folgenden Auswertung einen weiteren Abgleich des Nullmodells mit dem Gesamtmodell. Die Güte des Modells ist hoch, wenn die Prädiktoren gut voneinander getrennt werden können, also ihre Effekte zu

spezifizieren sind. Dies wird berechnet durch den Pseudo-R²-Koeffizienten (Tabelle 13).

Der Cox & Snell R²-Koeffizient gibt mit einem Wert von 0,167 an, dass die Schätzung um 16,7% verbessert wird, wenn anstelle des Nullmodells das Prädiktorenmodell benutzt wird. Dieser Wert kann ebenso wie der McFadden R²-Wert nicht den Wert von 1,000 annehmen und erlaubt demnach keine eindeutige inhaltliche Interpretation.

Das Maß von Nagelkerke ist ein Gütekriterium, dass den Anteil der Varianz der abhängigen Variablen angibt, der sich mit dem Forschungsmodell erklären lässt. Weil der Wert von Nagelkerke im optimalen Fall einen Wert von Eins annehmen kann, gilt er als am ehesten interpretierbar.

Güte des Modells, Pseudo R ² - Koeffizient	
Cox und Snell	0,167
Nagekerke	0,223
McFadden	0,132

Tabelle 13: Güte des Modells: Die Modellgüte gilt aufgrund der hier dargestellten Werte als ausreichend.

Der Nagelkerke - R² Wert gilt mit 0,223 zwar auch als niedrig, aber als akzeptabel für eine Interpretation bezüglich der Frage, ob das Forschungsmodell eine Anpassung an die wahren kausalen Zusammenhänge darstellt:

Die Güte des Prädiktorenmodells gilt hier als ausreichend, denn der Stichprobenumfang ist relativ niedrig und eine Variable (*Gender*) trägt nicht zur Verbesserung des Modells bei. Weil aber mit dieser Testung zwei Logit-Modelle verglichen werden, sind die Werte modellinterne Angaben und deshalb nur relativ.

Den Vergleich zum Prädiktorenmodell, in dem sämtliche unabhängigen Variablen bewertet werden, gibt Tabelle 14 an (Prüfung der Merkmale):

Prädiktorenmodell, Likelihood – Quotiententest

Prädiktoren	Kriterien für die Modellanpassung			
	-2 Log-Likelihood	Chi- Quadrat	Freiheitsgrade (Df)	Signifikanz
Nur konstanter Term	26,749	0,000	0	-
HCV1/4	41,256	14,507	1	0,000
Peginf	31,651	4,902	1	0,027
Gender	26,752	0,003	1	0,953
V444Awt	34,381	7,632	1	0,006

Tabelle 14: Prädiktorenmodell: Mit hoher Signifikanz ist belegt, dass die Prädiktoren HCV1/4, Peginf, V444Awt für sich allein betrachtet einen Einfluss auf das Therapieansprechen ausüben. Df = Freiheitsgrade; *Gender* = Geschlecht; HCV1/4 = Genotyp 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Peginf = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; N = Stichprobenumfang; V444Awt = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Der Vergleich der -2Log-Likelihood Werte des Nullmodells mit denen des Prädiktorenmodells kann hier so interpretiert werden: Der -2Log Likelihood Wert des Nullmodells nennt einen „Schätzerfolg“, der gegebenenfalls um einen bestimmten Prozentanteil durch Berücksichtigung der Prädiktoren verbessert werden kann. Im Fall der Variable „*Gender*“ sind die Angaben für Nullmodell und um mit „*Gender*“ erweitertes Modell nahezu identisch, diese Variable hat somit keinen Effekt. Dagegen zeigen die Werte von HCV1/4 und Peginf und V444Awt höhere Werte als beim „konstanten Term“ angegeben und bedeuten deshalb bei ihrer Berücksichtigung eine Verbesserung des Schätzmodells. Mit hoher Signifikanz (und hohen Chi-Quadrat Werten) ist damit belegt, dass die Prädiktoren HCV1/4, Peginf, V444Awt für sich allein betrachtet einen Einfluss auf das Therapieansprechen ausüben.

Der Einfluss der einzelnen Prädiktoren wird in ihrem Ausmaß und ihrer Richtung im Rahmen der Wald-Statistik untersucht. Dabei werden die Variablen so zusammengefasst, dass diejenigen herausgefiltert werden können, die auf das Therapieansprechen den größten Einfluss haben. Gleichzeitig kann beurteilt werden, ob eine Variable mehr oder weniger Einfluss hat als eine andere. Die Testung erfolgt

so, dass jede Variable rechnerisch mit einer Referenzkategorie verglichen wird, bei der alle Variablen im Modell den Wert Null annehmen. Hier heißt das nun, dass man von einer weiblichen Patientin („Gender 0“) ausgeht, die weder mit dem Virusgenotyp 1 oder 4 infiziert ist („HCV1/4 0“), weder mit pegyliertem Interferon therapiert wurde („Pegifn 0“), noch durch eine Homozygotie für den V444A-Wildtyp („V444Awt 0“) charakterisiert ist. Ein negatives Vorzeichen des Regressionskoeffizienten B bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit dieser Referenzperson, ein positives Therapieansprechen (SVR 1) zu erreichen, vermindert wird, wenn sie diese Variablenausprägung besitzt. Und umgekehrt bedeutet ein positives Vorzeichen, dass das Therapieansprechen erhöht wird, wenn das Merkmal nachzuweisen ist.

Die Kodierung „=0“, bzw. „=1“ in Tabelle 15 bedeutet: Wenn die Nullhypothese verifiziert ist, ist der Regressionskoeffizient B gleich Null und der Term „HCV1/4 =1“ gilt. Wenn die Nullhypothese nicht verifiziert ist, dann gilt die Zeile „HCV1/4 =0“, weshalb die Ziffern 0 bzw. 1 sich auf die Nullhypothese (ja:1, nein:0) beziehen und keinesfalls bedeuten, das Merkmal liegt vor oder nicht.

Parameterschätzung, Wald – Statistik								
SVR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz -niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
0 Konstanter Term	-0,992	0,493	4,049	1	0,044		0	-
HCV1/4 = 0 HCV1/4 = 1	-1,760 0	0,507 -	12,063 -	1 0	0,001 -	0,172 -	0,664	0,465
Pegifn = 0 Pegifn = 1	1,415 0	0,697 -	4,120 -	1 0	0,042 -	4,115 -	1,050	16,129
Gender = 0 Gender = 1	0,021 0	0,361 -	0,003 -	1 0	0,953 -	1,022 -	0,503	2,073
V444Awt = 0 V444Awt = 1	1,308 0	0,497 -	6,915 -	1 0	0,009 -	3,699 -	1,395	9,805

Tabelle 15: Parameterschätzung. Die Variablen Pegifn, Gender und V444Awt zeigen einen definierbaren Einfluss auf das Therapieansprechen. Weil sich die Werte der Odds Ratio als Verhältniszahlen unabhängig von den Größen der tatsächlich getesteten Patientengruppen ergeben, kann man die Datenwerte auf eine Gesamtpopulation übertragen B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = Odds Ratio; Gender 0 = weibliches Geschlecht; Gender 1 = männliches Geschlecht; HCV1/4 0 = Vorliegen des Genotyps 2 oder 3 des Hepatitis C-Virus; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; Pegifn 0 = Behandlung mit Standard-Interferon; Pegifn 1 = Behandlung mit pegyliertem Interferon alfa; V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Das negative Vorzeichen des Regressionskoeffizienten B der Variablen „HCV1/4“ zeigt an, dass ausgehend von der Referenzkategorie (Personen, die nicht mit dem Genotyp 1 oder 4 infiziert sind) die Wahrscheinlichkeit sinkt, ein Therapieansprechen zu erwirken, falls der Genotyp 1 oder 4 nachzuweisen ist. Die Nullhypothese, dass der HCV-Genotyp keinen Einfluss ausübt, muss zurückgewiesen werden. Die Variable „Gender“ hat einen Regressionswert von $B = 0,02$, das heißt ungefähr gleich Null. Das bedeutet also, dass es keine Wahrscheinlichkeit dafür gibt, dass diese Variable überhaupt einen Einfluss darauf hat, ob eine *Sustained Virological Response* zustande kommt. Die Nullhypothese ist verifiziert. Die Regressionskoeffizienten der Variablen „Pegifn“ und „V444Awt“ sind größer als Eins und signalisieren damit eine höhere Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Therapieansprechens in Relation zur Referenzkategorie.

Die Variablen werden am eindeutigsten unter dem Aspekt der *Odds Ratio* (Exp (B)) betrachtet: Der Exp(B) Wert der Variablen „Gender“ liegt nahezu bei 1 und signalisiert damit, dass die Wahrscheinlichkeit SVR 1 zu bewirken, für „Gender 0“ ebenso groß ist wie für die Gruppe mit dem Merkmal „Gender 1“. Der Variablen „HCV1/4“ ist ein Wert von 0,172 zugewiesen, das bedeutet, die Chancen der Gruppe der Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 sind kleiner, ein Therapieansprechen zu erzielen, als die Chancen der Patienten der Referenzgruppe mit den Genotypen 2 oder 3. Die Variablen „Pegifn“ und „V444Awt“ sind mit *Odds-Ratio* Werten deutlich über Null ausgewiesen. Damit sind ihre Chancen eines dauerhaften Therapieansprechens für diejenigen Patienten, die mit pegyliertem Interferon behandelt wurden und die den V444A-Wildtyp homozygot aufweisen gegenüber den Referenzgruppen sehr viel größer.

Die Nullhypothese, die besagt, dass die untersuchten Variablen keinen Einfluss auf das Therapieansprechen haben, kann nicht verifiziert werden, weil drei Variablen einen definierbaren Einfluss auf das Therapieansprechen aufweisen. Weil sich die Werte der *Odds Ratio* als Verhältniszahlen unabhängig von den Größen der tatsächlich getesteten Patientengruppen ergeben, kann man die Datenwerte auf eine Gesamtpopulation übertragen.

Zusammenfassung:

Die statistische Auswertung der in der Forschungsarbeit erhobenen empirischen Datenwerte erlaubt die Verifizierung der Forschungshypothese. Das Modell der Auswahl der Prädiktoren erklärt den Einfluss auf das Therapieansprechen.

Zusammenfassend ist hiermit nachgewiesen worden, dass ein Therapieansprechen bei denjenigen Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus-Infektion am wahrscheinlichsten ist, die mit dem vorgestellten Therapieschema behandelt wurden und gleichzeitig eine Homozygotie für den V444A-Wildtyp aufweisen. Es ist nicht therapieentscheidend, ob der jeweilige Patient männlich oder weiblich ist. Das Therapieansprechen wird als verbessert registriert, wenn die Infektion nicht mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 vorliegt.

4.2 Interleukin-28B

Die Zielparameter der Untersuchungen sind die *End of Treatment-Response* (ETR) und die *Sustained Virological Response* (SVR), wobei als sekundärer Parameter die Hepatitis C-Viruslast bestimmt wird. Bei einer *Response* muss die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze von 12 U/ml liegen.

Die Forschungshypothese besagt, dass eine Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus rs8099917 und das Therapieansprechen des Patienten assoziiert sind. Dafür wird der simultane Einfluss der untersuchten unabhängigen Variablen HCV-Genotyp, HCV-RNA, V444A-Genotyp, Alter und Geschlecht auf die *Response* der einzelnen Patienten mit Hilfe der multivariaten logistischen Regression (Cox-Modell) bestimmt. Signifikanz und Relevanz jedes Einflussfaktors werden mit den anderen Faktoren im Modell verrechnet. Der dichotome Charakter jedes Parameters wird zuvor mit der deskriptiven Statistik beschrieben.

4.2.1 Zusammenhangstests

Es soll hier statistisch überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Therapieerfolg (ETR, SVR), dem Genotyp des Hepatitis C-Virus (HCV1/4), dem V444A-Polymorphismus und dem Interleukin 28B-Polymorphismus existiert. Im Folgenden werden Patienten, die das T-Allel des IL28B-Polymorphismus homozygot aufweisen als „IL28B 1“ zusammengefasst, diejenigen Patienten, die das Allel nicht oder heterozygot tragen sind als „IL28B 0“ klassifiziert.

Die Nullhypothese besagt, dass ein Therapieerfolg (ETR oder SVR) unabhängig vom IL28B-Genotyp und vom V444A-Polymorphismus in gleichem Maße erreicht werden kann. Die Forschungshypothese besagt, dass die unabhängigen Variablen „IL28B 1“ und „V444Awt 1“ mit den abhängigen Variablen ETR und SVR korreliert sind.

Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens					
			IL28B 0	IL28B 1	Gesamt
ETR	0	absolute Häufigkeit	69	29	98
		erwartete Häufigkeit	46	52	
	1	absolute Häufigkeit	95	159	254
		erwartete Häufigkeit	118	136	
	Gesamt		164	188	352
SVR	0	absolute Häufigkeit	115	83	198
		erwartete Häufigkeit	92	106	
	1	absolute Häufigkeit	49	105	154
		erwartete Häufigkeit	72	82	
	Gesamt		164	188	352

Tabelle 16: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens. ETR 0 = kein Erreichen einer *End of Treatment-Response* (keine negative HCV-RNA bei Therapieende); ETR 1 = Erreichen einer *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR 0 = kein Erreichen einer *Sustained Virological Response* (kein dauerhaftes Therapieansprechen, positive HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); SVR 1 = Erreichen einer *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); IL28B 0 = Homozygotie oder Heterozygotie für das G-Allel des IL28B-Polymorphismus; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Aus den Differenzen zwischen absoluten und erwarteten Häufigkeiten lässt sich mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson auf dem festgelegten Signifikanzniveau von

$p=0.05$ und bei einem Freiheitsgrad ($Df=1$) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen prüfen (Tabelle 17).

Chi-Quadrat-Test nach Pearson - Korrelation des IL28B-Polymorphismus mit dem Therapieansprechen		
	ETR	SVR
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	30,960	24,011
Freiheitsgrade (Df)	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,000	0,000

Tabelle 17: Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Es ist mit hoher Signifikanz gegeben, dass das Vorhandensein des IL28B-Polymorphismus Einfluss auf das Therapieansprechen hat. Df = Freiheitsgrade; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende).

Tabelle 17 zeigt, dass bei Vorhandensein des Merkmals „IL28B 1“ der Anteil der Patienten, die ein ETR und ein SVR erreichen, am höchsten ist. Die Nullhypothese, dass ein ETR und ein SVR unabhängig vom IL28B-Genotyp in gleichem Maße erreicht werden, kann (deskriptiv) statistisch nicht bestätigt werden. Der Anteil der Patienten mit einer Homozygotie für das T-Allel und positiver Therapieansprechen ist deutlich höher als der Anteil an Patienten, die den IL28B-Genotyp TG/GG tragen. Die hohen Differenzen zwischen erwarteten und beobachteten Häufigkeiten spiegeln sich im hohen Chi-Quadrat-Wert nach Pearson wider. Bei einem kritischen Chi-Quadrat-Wert von 3,84 ist mit hoher Signifikanz gegeben, dass das Vorhandensein des IL28B-Polymorphismus einen Einfluss auf das Therapieansprechen hat.

Auf Grundlage der in Teil 4.1.1ff gezeigten Ergebnisse und der in Tabelle 17 dargestellten Befunde sollte untersucht werden, ob der V444A-Polymorphismus und der IL-28B-SNP einen additiven Effekt bezüglich des Therapieansprechens aufweisen.

Tabelle 18 zeigt: 188 Patienten tragen das T-Allel des IL28B-Polymorphismus homozygot. Die Gruppe der Patienten, die gleichzeitig homozygot für den Wildtyp des V444A-Polymorphismus ist, erreicht am häufigsten eine Therapieresponse.

Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens					
IL28B 1			V444Awt 0	V444Awt 1	Gesamt
ETR	0	absolute Häufigkeit	28	1	29
		erwartete Häufigkeit	24	5	
	1	absolute Häufigkeit	130	29	159
		erwartete Häufigkeit	133	25	
		Gesamt	158	30	188
SVR	0	absolute Häufigkeit	75	8	83
		erwartete Häufigkeit	69	13	
	1	absolute Häufigkeit	83	22	105
		erwartete Häufigkeit	88	16	
		Gesamt	158	30	188

Tabelle 18: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens. ETR 0 = kein Erreichen einer *End of Treatment-Response* (keine negative HCV-RNA bei Therapieende); ETR 1 = Erreichen einer *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR 0 = kein Erreichen einer *Sustained Virological Response* (kein dauerhaftes Therapieansprechen, positive HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); SVR 1 = Erreichen einer *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; IL28B 0 = Homozygotie oder Heterozygotie für das G-Allel des IL28B-Polymorphismus; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Die Nullhypothese, dass der V444A-Polymorphismus nicht therapie relevant ist, kann nicht bestätigt werden. Der Chi-Quadrat-Wert nach Pearson ist analog zu den niedrigen Differenzen zwischen erwarteten und gemessenen Häufigkeiten niedrig und es ergibt sich eine sehr schwache Signifikanz (ETR: 0,053; SVR: 0,045) (Tabelle 19).

Die errechneten Chi-Quadrat-Werte liegen aber oberhalb des kritischen Chi-Quadrat-Wert von 3,84, so dass die Nullhypothese verworfen werden muss.

Chi-Quadrat-Test nach Pearson - Korrelation des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens

	ETR	SVR
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	4,001	4,425
Freiheitsgrade (Df)	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,045	0,035
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,053	0,045
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,031	0,036

Tabelle 19: Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt hier, dass der V444A-Polymorphismus bei Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus therapierelevant ist. Df = Freiheitsgrade; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende).

Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens

HCV1/4 1			IL28B 0	IL28B 1	Gesamt
ETR	0	absolute Häufigkeit	66	23	89
		erwartete Häufigkeit	44	45	
	1	absolute Häufigkeit	72	120	192
		erwartete Häufigkeit	94	98	
		Gesamt	138	143	281
SVR	0	absolute Häufigkeit	105	72	177
		erwartete Häufigkeit	87	90	
	1	absolute Häufigkeit	33	71	104
		erwartete Häufigkeit	51	53	
		Gesamt	138	143	281

Tabelle 20: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des IL28B-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens. ETR 0 = kein Erreichen einer *End of Treatment-Response* (keine negative HCV-RNA bei Therapieende); ETR 1 = Erreichen einer *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR 0 = kein Erreichen einer *Sustained Virological Response* (kein dauerhaftes Therapieansprechen, positive HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); SVR 1 = Erreichen einer *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); IL28B 0 = Homozygotie oder Heterozygotie für das G-Allel des IL28B-Polymorphismus; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Chi-Quadrat-Test Test - Korrelation des IL28B -Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens

	ETR	SVR
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	32,697	19,955
Freiheitsgrade (Df)	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,000	0,000

Tabelle 21: Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Es liegt ein signifikanter Einfluss des IL28B-Polymorphismus auf den Therapieerfolg innerhalb dieses Patientenkollektivs (HCV-Genotyp 1 oder 4) vor. Df = Freiheitsgrade; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende).

Die Tabellen 20 und 21 erfassen nur die Patienten ($N_{\text{Gesamt}} = 281$), die mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 infiziert sind. Es wird untersucht, ob bei diesem Patientenkollektiv der IL28B-Polymorphismus einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen hat. Bei einem Chi-Quadrat-Wert nach Pearson mit 32,697 bezüglich ETR und 19,955 bezüglich SVR (jeweils > der kritischen Chi-Quadrat-Wert von 3,84) ist mit einem zugehörigen p-Wert von jeweils < 0,001 von einem signifikanten Einfluss der Genvariante auf den Therapieerfolg innerhalb dieses Patientenkollektivs auszugehen.

Die Tabellen 22 und 23 berücksichtigen das Patientenkollektiv, das einerseits mit dem Genotyp 1/4 infiziert ist, andererseits gleichzeitig durch eine Homozygotie für das *Response*-Allel des IL28B-SNP charakterisiert wird. Zu dieser Gruppe gehören 143 Patienten. Es soll hier untersucht werden, inwieweit der V444A-SNP das Therapieansprechen zusätzlich beeinflusst.

Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 und Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens

HCV1/4 1 und IL28B 1			V444Awt 0	V444Awt 1	Gesamt
ETR	0	absolute Häufigkeit	22	1	23
		erwartete Häufigkeit	19	4	
	1	absolute Häufigkeit	96	24	120
		erwartete Häufigkeit	99	21	
	Gesamt		118	25	143
SVR	0	absolute Häufigkeit	66	6	72
		erwartete Häufigkeit	59	13	
	1	absolute Häufigkeit	52	19	71
		erwartete Häufigkeit	59	12	
	Gesamt		118	25	143

Tabelle 22: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des V444A-Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 und Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus bezüglich des Therapieansprechens. ETR 0 = kein Erreichen einer *End of Treatment-Response* (keine negative HCV-RNA bei Therapieende); ETR 1 = Erreichen einer *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR 0 = kein Erreichen einer *Sustained Virological Response* (kein dauerhaftes Therapieansprechen, positive HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); SVR 1 = Erreichen einer *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt 0 = Heterozygotie oder Homozygotie für den V444A-SNP; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Chi-Quadrat-Test Test - Korrelation des IL28B -Polymorphismus bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 oder 4 bezüglich des Therapieansprechens

	ETR	SVR
Chi-Quadrat nach Pearson, Wert	3,278	8,414
Freiheitsgrade (Df)	1	1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,070	0,004
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,079	0,004
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,055	0,003

Tabelle 23: Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Bezüglich der SVR ist signifikant nachgewiesen, dass der V444A-Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv therapierelevant ist. Df = Freiheitsgrade; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende).

Von den insgesamt 143 Patienten kann bei 120 ein positives ETR gemessen werden, bei 71 ist ein positives SVR nachweisbar. Mit einem Chi-Quadrat-Wert nach Pearson von 3,27 (ETR), der unterhalb des kritischen Wertes von 3,84 liegt und einem Signifikanzniveau $p = 0,079 > 0,05$ zeigen die Ergebnisse, dass der V444A-Polymorphismus das Therapieansprechen bezüglich des ETR nicht beeinflusst (Tabelle 23). Bezüglich der SVR ist signifikant nachgewiesen, dass der V444A-Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv therapierelevant ist.

Das bedeutet im Zusammenhang der Forschungshypothese, dass die individuellen genetischen Merkmalscharakteristika des jeweiligen Patienten relevant für den Therapieerfolg sind.

4.2.2 Logistische Regression

Mit der logistischen Regression (Tabelle 24 und 25) wird hier die relative Wahrscheinlichkeit überprüft, mit der eine *Therapieresponse* in Abhängigkeit der jeweils unabhängigen Variablen IL28B- und V444A-Polymorphismus und HCV-Genotyp erreicht wird. Je höher der positive Regressionskoeffizient B ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, eine ETR beziehungsweise eine SVR zu erzielen. Ein negativer Regressionskoeffizient wie bei dem HCV-Genotyp führt zu weiter reduzierten Wahrscheinlichkeiten einer ETR / SVR.

Die Wald-Statistik nimmt die Signifikanzprüfung des Regressionskoeffizienten vor. Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis (*Odds Ratio*), eher ETR 1 / SVR 1 als ETR 0 / SVR 0 zu bewirken, erhöht sich um den Faktor 2,634 / 2,613, wenn der V444A-Wildtyp (V444Awt 1) nachweisbar ist. Das heißt, dass ein Patient eine um den Faktor 2,634 erhöhte Chance hat, ein ETR zu erreichen, als wenn er diese Variante des Gallensäuretransporters nicht hätte. Deutlich höher ist die Chance eines *Therapieresponse* bei Patienten mit einer Homozygotie für das *Response* Allel des IL28B-SNP (IL28B 1). Im Vergleich zu Patienten, die mit dem Virus-Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, erniedrigt sich die Chance auf einen Therapieerfolg um den

Faktor 0,315 bezüglich ETR und 0,262 bezüglich SVR bei Patienten, die mit dem Genotyp 1 oder 4 infiziert sind.

Logistische Regression für ETR								
ETR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz -niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	0,969	0,485	3,91	1	0,046	2,634	1,017	6,821
HCV1/4 1	-1,155	0,421	7,527	1	0,006	0,315	0,138	0,719
IL28B 1	1,409	0,274	26,479	1	0,000	4,093	2,393	7,000

Tabelle 24: Logistische Regression für ETR: Die *Odds Ratio* ein ETR zu erreichen, erhöht sich um den Faktor 2,634 wenn der V444A-Wildtyp nachweisbar ist bzw. um den Faktor 4,093 bei Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Logistische Regression für SVR								
SVR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz -niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	0,961	0,364	6,948	1	0,008	2,613	1,279	5,338
HCV1/4 1	-1,339	0,315	18,077	1	0,000	0,262	0,141	0,486
IL28B 1	1,132	0,248	20,909	1	0,000	3,101	1,909	5,037

Tabelle 25: Logistische Regression für SVR: Die *Odds Ratio* ein SVR zu erreichen, erhöht sich um den Faktor 2,613 wenn der V444A-Wildtyp nachweisbar ist bzw. um den Faktor 3,101 bei Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Zusammengefasst lässt sich erkennen, dass der Therapieerfolg von den individuellen Charakteristika (Genmerkmalen) des Patienten abhängig ist.

Um zu bewerten, ob die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen *Response*unterschied trotz differierender Voraussetzungen gibt, gültig ist und um gleichzeitig abzuschätzen, welchen Einfluss die (unabhängigen) prognostischen Parameter ausüben, wird per SPSS die multivariate logistische Regression (Cox-Modell) durchgerechnet.

4.2.3 Logistische Regression, das Cox – Modell

Mit der multivariaten Regression nach Cox werden die Einflussgrößen der *Response*reaktionen (ETR und SVR) untersucht (Tabelle 26 und 27). Als messbare und gemessene Parameter sind die Patientendaten bezüglich demographischer Variablen (Geschlecht/Alter) und klinischer Variablen (Viruslast/ Genotyp und Thrombozytenzahl) als prognostische Faktoren erfasst worden. Diese Daten gelten als Kovariaten, die als mögliche Einflussgrößen die *Therapieresponse* manipulieren.

Cox-Modell für ETR in Abhängigkeit vom V444A-Polymorphismus								
ETR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz -niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	1,135	0,469	5,859	1	0,015	3,112	1,241	7,805
Gender	0,367	0,253	2,100	1	0,147	1,444	0,735	2,106
HCV1/4 1	-1,245	0,409	9,259	1	0,002	0,288	0,129	0,642
Alter (<vs.> 40 J.)	0,271	0,293	0,551	1	0,458	1,242	0,700	2,205
Viruslast (<vs.> 400.000 U/ml)	-0,422	0,278	2,299	1	0,129	0,656	0,380	1,131
Thrombozyten (<vs.> 150.000/µl)	0,780	0,341	5,232	1	0,022	2,181	1,118	4,256

Tabelle 26: Cox-Modell für ETR: Der V444A-SNP hat hier mit einer *Odds Ratio* von 3,112 den statistisch größten Einfluss auf einen Therapieerfolg. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); Gender = Geschlecht; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Cox-Modell für SVR in Abhängigkeit vom V444A-Polymorphismus

SVR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz- niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	1,080	0,352	9,398	1	0,002	2,944	1,476	5,872
Gender	0,138	0,233	0,347	1	0,556	1,147	0,726	1,813
HCV1/4 1	-1,383	0,305	20,622	1	0,000	0,251	0,138	0,456
Alter (<vs.> 40 J.)	-0,181	0,264	0,468	1	0,494	0,835	0,497	1,401
Viruslast (<vs.> 400.000 U/ml)	-0,535	0,246	4,719	1	0,030	0,586	0,361	0,949
Thrombozyten (<vs.> 150.000/μl)	0,723	0,348	1,953	1	0,162	1,626	0,822	3,3214

Tabelle 27: Cox-Modell für SVR: Der V444A-SNP hat hier mit einer *Odds Ratio* von 2,944 den statistisch größten Einfluss auf einen Therapieerfolg. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); Gender = Geschlecht; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp.

Der Vergleich der absoluten Messdaten (siehe Häufigkeiten) zeigt bereits, dass das Therapieansprechen deutlich von dem Genotyp des V444A-Polymorphismus abhängt.

Mit der multivariaten Regression wird der Effekt (*Response*) der Therapie abgeschätzt, wobei mehrere Variablen gleichzeitig berücksichtigt werden. In der SPSS-Auswertung der Tabellen 26 und 27 ist abzulesen, dass Geschlecht und Alter des Patienten keine therapielevanten Variablen sind, da kein zum 5% Niveau signifikanter Einfluss vorliegt.

Der Vergleich der *Odds Ratio* der dichotomen Kovariaten macht deutlich, wie diese mit der *Response* assoziiert sind: Während die HCV-Genotypen 1 und 4 eine reduzierte Chance aufweisen, einen ETR-Therapieerfolg zu bewirken, haben demgegenüber die Genotypen 2 und 3 eine erhöhte Chance auf eine ETR. Bezüglich des dauerhaften Therapieansprechens (SVR) vermindert sich für die Genotyp 1 und 4 ebenfalls die Erfolgschance.

Die Berechnung der *Odds Ratio* (Exp (B)) zeigt, dass Patienten mit dem V444A-Wildtyp eine 3,112-fach (95% Konfidenzintervall 1,241 - 7,805) erhöhte Wahrscheinlichkeit aufweisen eine ETR und eine 2,944fach (95% Konfidenzintervall 1,476 – 5,872) erhöhte Wahrscheinlichkeit haben eine SVR zu erreichen.

Das Resultat der Auswertung der ETR unter zusätzlicher Berücksichtigung des IL28B-Polymorphismus zeigt Tabelle 28:

Cox-Modell für ETR in Abhängigkeit vom IL28B-Polymorphismus								
ETR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz- niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	0,969	0,485	3,91	1	0,046	2,634	1,017	6,821
Gender	0,219	0,268	0,664	1	0,415	1,244	0,735	2,106
HCV1/4 1	-1,155	0,421	7,527	1	0,006	0,315	0,138	0,719
Alter (<vs.> 40 J.)	0,231	0,305	0,573	1	0,449	1,260	0,693	2,293
Viruslast (<vs.> 400.000 U/ml)	-0,621	0,296	4,405	1	0,036	0,538	0,301	0,960
Thrombozyten (<vs.> 150.000/μl)	0,820	0,362	5,129	1	0,024	2,271	1,117	4,168
IL28B 1	1,409	0,274	26,479	1	0,000	4,093	2,393	7,000

Tabelle 28: Cox-Modell für ETR: Der IL28B-SNP hat mit einer *Odds Ratio* von 4.093 den statistisch größten Einfluss auf eine ETR. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; ETR = *End of Treatment-Response* (negative HCV-RNA bei Therapieende); Gender = Geschlecht; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Bezüglich des dauerhaften Therapieansprechens unter Einbeziehung von IL28B ergibt sich die Statistik (Tabelle 29):

Cox-Modell für SVR in Abhängigkeit vom IL28B-Polymorphismus

SVR	B	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz- niveau	Exp(B)	95% Konfidenz- intervall für Exp (B)	
							Unterer Wert	Oberer Wert
V444Awt 1	0,961	0,364	6,948	1	0,008	2,613	1,279	5,338
Gender	-0,035	0,244	0,021	1	0,885	0,965	0,599	1,557
HCV1/4 1	-1,339	0,315	18,077	1	0,000	0,262	0,141	0,486
Alter (<vs.> 40 J.)	-0,198	0,273	0,525	1	0,469	0,820	0,480	1,401
Viruslast (<vs.> 400.000 U/ml)	-0,687	0,259	7,035	1	0,008	0,503	0,303	0,836
Thrombozyten (<vs.> 150.000/μl)	0,504	0,360	1,951	1	0,162	1,655	0,816	3,354
IL28B 1	1,132	0,248	20,909	1	0,000	3,101	1,909	5,037

Tabelle 29: Cox-Modell für SVR: Der IL28B-SNP hat mit einer *Odds Ratio* von 3,101 den statistisch größten Einfluss auf eine ETR. B = Regressionskoeffizient B; Df = Freiheitsgrad; Exp(B) = *Odds Ratio*; SVR = *Sustained Virological Response* (dauerhaftes Therapieansprechen, negative HCV-RNA 6 Monate nach Therapieende); Gender = Geschlecht; HCV1/4 1 = Vorliegen des Genotyps 1 oder 4 des Hepatitis C-Virus; V444Awt 1 = Homozygotie für den V444A-Wildtyp; IL28B 1 = Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus.

Unter Berücksichtigung des IL28B-Polymorphismus werden die ursprünglich betrachteten Kovariablen nicht wesentlich verändert, ihr Verhältnis zum Endergebnis bleibt fast gleich. Mit dem IL28B-SNP aber kommt eine Variable hinzu, die mit einer *Odds Ratio* von 4.093 (ETR) und 3,101 (SVR) den hier statistisch größten Einfluss auf einen Therapieerfolg hat.

Als zusammenfassendes Ergebnis zeigt die Statistik, dass bei einem Vergleich der Patientengruppen die Therapie am stärksten durch das Vorhandensein der Variablen IL28B beeinflusst wird. Für alle Gruppen war die Dauer der Therapie gleich und der Zeitpunkt der *Response*messung festgelegt. Alter und Geschlecht sind in dieser Untersuchung keine die Therapie beeinflussenden Faktoren.

Aus der hier gezeigten Bestätigung der Forschungshypothese kann geschlussfolgert werden, dass individuelle Patientendaten prognostisch relevant sind und zukünftig bei Therapiemaßnahmen beachtet werden sollten.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des V444A-Polymorphismus der Gallensalzexportpumpe BSEP rs2287622 sowie des Interleukin-28B-Polymorphismus rs8099917 auf den Erfolg einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion untersucht. Das untersuchte Probandenkollektiv umfasst Patienten, die wegen einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion in der Hepatitisambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf in dem Zeitraum von Januar 2003 bis Dezember 2008 mit einer antiviralen Kombinationstherapie behandelt wurden. Die klinischen Parameter, welche unter der Therapie erhoben wurden und anhand derer ein Therapieerfolg festzumachen ist, wurden retrospektiv gesammelt. Der V444A-Polymorphismus wurde an DNA-Proben der Patienten durch Schmelzkurvenanalyse und gegebenenfalls DNA-Sequenzierung analysiert, der IL-28B-Polymorphismus wurde mittels eines TaqMan®-Assays bestimmt. Eine statistische Korrelation von Genvarianten und Therapieerfolg wurde mittels Chi-Quadrat-Test und Regressionsanalysen durchgeführt.

In dieser Arbeit konnte anhand eines großen Patientenkollektivs nachgewiesen werden, dass HCV-Patienten, die den V444A-Polymorphismus homozygot oder heterozygot tragen, signifikant schlechter eine dauerhafte Viruselimination erreichen, als Patienten die homozygot das Wildtyp-Allel aufweisen.

Die Exkretion der Gallensalze in die Canaliculi wird unter physiologischen Bedingungen von der Gallensalzexportpumpe BSEP kontrolliert [43]. Varianten innerhalb der für BSEP kodierenden Gensequenz sind mit verschiedenen cholestatischen Lebererkrankungen wie der progressiven familiären intrahepatischen

Cholestase (PFIC) oder der benignen rekurrenten intrahepatischen Cholestase (BRIC) assoziiert. Patienten, bei denen der V444A-Polymorphismus der Gallensalzpump BSEP homozygot auf beiden Allelen nachgewiesen werden kann, scheinen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer intrahepatischen Schwangerschaftscholestase [85; 104] oder einer medikamenten-induzierten Cholestase zu haben [86].

Der V444A-Polymorphismus beeinflusst die hepatozelluläre Expression von BSEP. Patienten, die homozygot für diese Genvariante sind, zeigen eine verminderte Expression des Proteins im Vergleich zu Patienten, bei denen homozygot das Wildtyp-Allel nicht oder heterozygot vorliegt [102]. Diese, obgleich moderat verminderte Expression kann zu einer erhöhten Konzentration von Gallensalzen innerhalb der Hepatozyten führen, ohne dass es zwangsläufig zu einer erhöhten Serumkonzentration der Gallensalze kommt, weil diese unter anderem auch durch den enterohepatischen Kreislauf reguliert wird [105].

Eine Dysregulation auf Transkriptionsebene scheint nicht als Ursache für die verminderte BSEP-Expression in Betracht zu kommen, da normale Mengen BSEP-mRNA bei Vorliegen des V444A-Polymorphismus nachgewiesen werden können. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der SNP zu einer vermehrten Instabilität des Proteins führt und möglicherweise das *Trafficking* zur kanalikulären Membran beeinflusst [126; 127].

5.1 Gallensalze beeinflussen das Interferonsignaling

Durch die Arbeit von Podevin et al. [124] konnte ein Einfluss der Gallensalze auf das Interferon-*Signaling* gezeigt werden.

Podevin et al. verwendeten drei verschiedene Zelllinien, (HepG2, Huh-7 und PLC/PRF-5), die mit steigenden Interferon-Dosierungen stimuliert wurden. Hier konnte eine dosisabhängige Induktion der 2'-5'-OAS-Aktivität nachgewiesen werden.

Die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase gehört zu den antiviralen Proteinen, die nach zellulärer Aktivierung durch Typ-I Interferone gebildet werden. Nach Stimulation durch virale doppelsträngige RNA synthetisiert die 2'-5'-OAS Adenylatoligomere aus ihrem Substrat ATP. Diese Oligoadenylate binden an die RNase L, eine zytoplasmatische Endonuklease, wodurch diese homodimerisiert und somit aktiviert wird. Die Funktion der RNase L ist die Spaltung viraler und zellulärer Einzelstrang-RNA, was zu einer Inaktivierung der Ribosomen und damit zu einer Hemmung der viralen und zellulären Proteinbiosynthese führt [30; 38; 39].

Bei einer konstanten Interferon-Dosis mit 100U/ml konnte nach Inkubation der Zellen mit CDCA, seinen Taurin- und Glycin-Konjugaten eine dosisabhängige Reduktion der 2'-5'-OAS-Aktivität erreicht werden. Während die basale Expression der Proteine 2'-5'-OAS, PKR und MxA auch unter Inkubation mit CDCA konstant blieb, konnte jedoch eine signifikant reduzierte Induktion dieser Proteine nach Interferon-Stimulation nachgewiesen werden. Als zugrunde liegende Ursache konnte eine CDCA-abhängige Reduktion der 2'-5'-OAS- sowie der MxA-Promotoraktivität in Rattenhepatozyten nachgewiesen werden. Die auf diese Weise verminderte Protein-Expression zieht eine verminderte antivirale Aktivität nach sich (Abbildung 15 Signalweg 1).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben endogenem auch therapeutisch appliziertes Interferon durch Gallensalze in seiner Wirkung gehemmt wird. Der V444A-Polymorphismus führt zu einer erhöhten intrazellulären Konzentrationen von CDCA und seinen Taurin- und Glycin-Konjugaten und kann möglicherweise auf dem Niveau der Expression und der Aktivität antiviraler Proteine, insbesondere der 2'-5'-OAS, einen Einfluss auf die Interferonwirkung aufweisen.

Podevin et al. beschreiben mit diesen Daten einen möglichen Mechanismus, der die in dieser Arbeit gezeigte Abhängigkeit des Therapieerfolgs bei chronischer HCV-Infektion vom V444A-Polymorphismus erklären könnte.

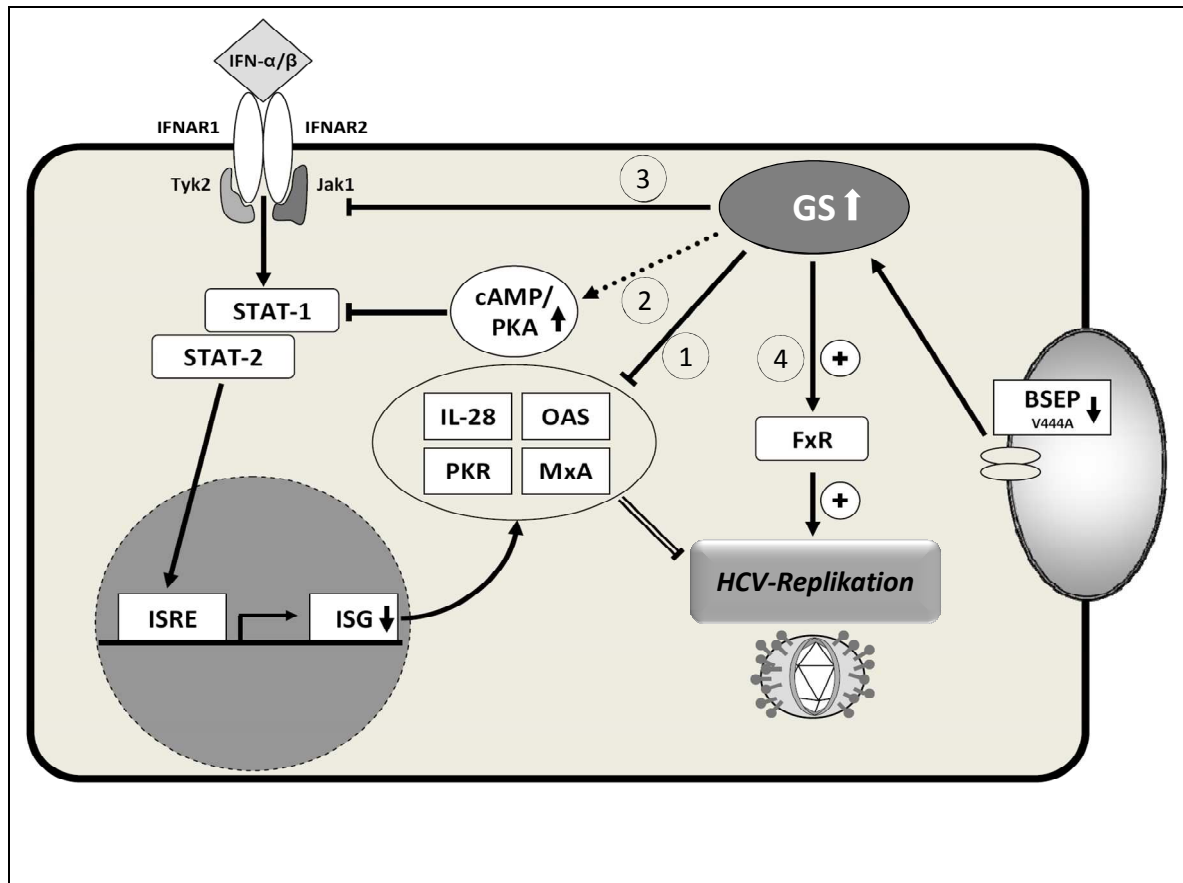


Abb. 15: **Einfluss der Gallensalze auf das Interferon-Signaling und die Virusreplikation.** Gallensalze beeinflussen die Interferon-Signalkaskade an verschiedenen Stellen und bewirken eine vermehrte HCV-Replikation. Signalweg 1: Gallensalze bewirken eine verminderte Expression der ISGs sowie eine verminderte Aktivität der antiviralen Proteine und reduzieren so den antiviralen Effekt der Interferone [124]. Signalweg 2: Gallensalze inhibieren cAMP- und PKA-abhängig die Aktivierung von STAT1 (gezeigt in LLC-PK-Zellen) [125]. Signalweg 3: Gallensalze inhibieren die Phosphorylierung von Jak1 und Tyk2 blockieren so die STAT-Aktivierung und die Expression antiviraler Proteine [133]. Signalweg 4: Aktivierung des Farnesoid X Rezeptor durch Gallensalze verstärkt die HCV-Replikation (gezeigt in Replikon-System mit Huh-7 Zellen) [134]. BSEP = bile salt export pump; GS = Gallensalze; IFN- α/β = Interferon- α/β ; IFNAR1/2 = Interferon- α/β receptor 1/2; Tyk2 = Tyrosine kinase 2; Jak1 = Janus kinase 1; STAT = signal transducer and activator of transcription; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA = Proteinkinase A; ISRE = Interferon stimulated response element; ISG = Interferon-stimulated genes; OAS = 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase; PKR = Proteinkinase; IL-28 = Interleukin28; FxR = Farnesoid X Rezeptor.

Einen weiteren potentiellen Angriffspunkt für Gallensalze innerhalb der Interferon-Signalkaskade stellen zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren wie STAT1 dar. Chang et al. [125] konnten zeigen, dass erhöhte Gallensalzkonzentrationen die STAT1-Phosphorylierung verringern und über eine vermutlich konsekutiv auftretende

verminderte Expression der antiviralen Proteine eine erhöhte Virusreplikation nachweisbar ist.

Nach Bindung von Interferon an seinen spezifischen Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der rezeptorassoziierten Januskinasen, welche anschließend Tyrosinreste der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Zusammen mit IRF-9 bilden die aktivierten STAT-Proteine den Komplex ISGF-3, welcher in den Zellkern transloziert und dort an die *Promotor*region der Interferon-stimulierten Gene bindet. Eine Inhibition innerhalb dieser Kaskade kann mit einer verminderten Expression Interferon-stimulierter Gene einhergehen und somit eine Reduktion der antiviralen Interferoneffekte bewirken.

Chang et al. untersuchten an LLC-PK-Zellen den Einfluss von Gallensalzen auf die Replikation des porcinen enterischen Calicivirus (PEC). In ihrer Arbeit wird demonstriert, dass eine Synthese von PEC-Viruspartikeln in LLC-PK-Zellen nur nach Inkubation der Zellen mit gallensalzhaltigem Darmsekret von keimfreien Versuchsschweinen nachweisbar ist. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass nach Stimulation der infizierten Zellen mit einzelnen Gallensalzen die PEC-Replikation zunahm, wobei GCDC und TCDC hier den größten Effekt aufwiesen, während UDC und TUDC keinen Einfluss auf die Replikation nahmen.

Als Ursache für diese vermehrte Virusreplikation wird ein intrazellulärer Anstieg von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) und eine nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) als ursächlich angesehen. Es konnte für alle Gallensalze, die eine vermehrte PEC-Replikation bewirken, ein dosisabhängiger cAMP-Anstieg in den LLC-PK-Zellen nachgewiesen werden. Dies wird über einen G-Protein gekoppelten Gallensalzrezeptor vermittelt. Durch Gabe von Suramin, welches eine Entkopplung der G-Proteine von ihren Rezeptoren bewirkt, konnte trotz Stimulation mit Gallensalzen eine Blockade der PEC-Replikation erreicht werden. Durch Hemmung der cAMP-Bildung durch Gabe des Adenylatcyclase-Inhibitors MDL12,3330A konnte ebenfalls die PEC-Replikation unterdrückt werden.

Es wurde angenommen, dass die Aktivierung des Gallensalzrezeptors TGR5 für den cAMP-Anstieg verantwortlich ist [125]. Keitel et al. [128] konnten jedoch zeigen, dass TGR5 nicht auf Hepatozyten exprimiert wird. Gallensalze nehmen demnach

unabhängig von diesem Rezeptor Einfluss auf die Replikation hepatotroper Viren wie HCV, so dass weitere Untersuchungen nötig sein werden, um den Mechanismus der Gallensalz-abhängigen Steigerung der cAMP-Konzentration zu identifizieren.

Da verschiedene Studien [129; 130; 131; 132] einen Einfluss von cAMP auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 diskutieren, wurde von Chang et al. die Abhängigkeit der STAT1-Aktivität von Gallensalzen untersucht. In den verwendeten LLC-PK-Zellen bewirken Gallensalze weiterhin eine Inhibition der IFN- α und IFN- γ vermittelten STAT1-Phosphorylation. Nach Blockade der intrazellulären cAMP-Synthese durch Gabe des Adenylatcyclase-Inhibitors MDL12,330A konnte die STAT1-Aktivierung durch Interferone wieder hergestellt werden.

Zusätzlich zu dem von Podevin et al. beschriebenen Einfluss der Gallensalze auf Aktivität und Expression der antiviralen Proteine zeigen die Daten von Chang et al. eine Interaktion von Gallensalzen mit der Interferon-induzierten STAT1-Phosphorylierung (Abbildung 15, Signalweg 2).

Ein dritter relevanter Angriffspunkt der Gallensalze innerhalb der Interferon-Signal-Kaskade wurde von Graf et al. [133] identifiziert.

Die mit dem Interferonrezeptor assoziierten Januskinasen JAK1 und TYK2 katalysieren nach Liganden-abhängiger Aktivierung des Rezeptors eine Phosphorylierung von zytoplasmatischen Tyrosinresten des Rezeptors. Dies ist Voraussetzung für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 und somit die Expression der Interferon-stimulierten Gene.

In der Arbeit von Graf et al. wurde gezeigt, dass in mit NTCPtransfizierten HepG2-Zellen die Inkubation mit den hydrophoben Gallensalzen TCDC und GCDC eine Inhibition der Interferon- α induzierten STAT-Phosphorylierung bewirkt. Als zugrundeliegender Mechanismus konnte eine verminderte Phosphorylierung der Januskinasen JAK1 und TYK2 nachgewiesen werden (Abbildung 15, Signalweg 3).

Zusammenfassend kann eine Inhibition des Interferon-*Signalings* durch Gallensalze an verschiedenen Stellen als mögliche Ursache für das schlechtere Therapieansprechen der HCV-Patienten, die heterozygot oder homozygot für den V444A-SNP sind, angesehen werden.

Diese inhibitorischen Effekte wirken jedoch nicht isoliert, sondern verstärken sich gegenseitig. Wie durch Chang und Graf beschrieben kommt es zum einen durch Gallensalze zu einer reduzierten STAT1-Phosphorylierung, infolgedessen wird die Expression der Interferon-stimulierten Gene und antiviralen Proteine geschwächt. Eine zusätzliche Verschlechterung des Therapieansprechens wird möglicherweise durch die Verminderung der Aktivität der antiviralen Proteine verursacht, wie von Podevin beschrieben. Diese Inhibition der Interferon-Kaskade und die verminderte Aktivität der antiviralen Proteine können die Viruselimination erschweren und eine hepatozelluläre Viruspersistenz fördern.

5.2 Gallensalze beeinflussen die Virusreplikation

Scholtes et al. [134] untersuchten im Jahr 2008 den Einfluss von Gallensalzen auf die Replikation des Hepatitis C-Virus.

In einem Replikon mit Huh7-Zellen wurde demonstriert, dass Gallensalze, insbesondere CDCA zu einem dosisabhängigen Anstieg der Virusreplikation führen. Interessanterweise waren nur unkonjugierte hydrophobe lipophile Gallensalze in der Lage, die Virusreplikation zu beeinflussen, konjugierte Gallensalze zeigten keinen relevanten Effekt. Da unkonjugierte lipophile Gallensalze im Gegensatz zu konjugierten Gallensalzen in der Lage sind durch Zellmembranen zu diffundieren, wurde angenommen, dass die Aktivierung eines intrazellulären Rezeptors für die verstärkte Virusreplikation verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden verschiedene nukleäre Rezeptoren wie der Farnesoid Rezeptor (FXR), der Pregnane X Rezeptor und der Vitamin D Rezeptor untersucht. Nur nach Applikation

eines FXR-Agonisten war ein Anstieg der Virusreplikation zu verzeichnen, so dass zur Evaluation der Bedeutung von FXR für die Virusreplikation weitere Versuche durchgeführt wurden. Es wurde der spezifische FXR-Inhibitor Guggulsterone (GGS) zum Replikon-System hinzugegeben, dies bewirkte trotz gleichzeitiger Inkubation mit CDCA eine signifikante Reduktion der Virusreplikation. Da FXR sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch in der Leber exprimiert wird [135], liefern diese Ergebnisse eine weitere Erklärung für den in unserer Arbeit gezeigten Einfluss des V444A-Polymorphismus auf das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion (Abbildung 15, Signalweg 4).

Zusammengefasst legen die Daten nahe, dass bei Homozygotie des V444A-Polymorphismus und konsekutiv reduzierter BSEP-Expression die intrazellulär erhöhten Gallensalze zu einer schlechteren zellulären Interferon-Antwort mit erschwerter Viruselimination führen, gleichzeitig wird über Aktivierung des Farnesoid X Rezeptor die Virusreplikation stimuliert.

Interessanterweise konnten Scholtes et al. eine vermehrte Virusreplikation nach Gallensalz-Gabe nur in Zellkulturen beobachten, die den Genotyp 1 exprimieren. Bei Zellen, die den Genotyp 2 exprimieren, war dieser Effekt nicht nachweisbar. Die Ergebnisse stimmen mit den in unserer Arbeit erhobenen Daten überein, da hier gezeigt werden konnte, dass der V444A-Polymorphismus lediglich einen signifikanten Effekt auf das dauerhafte Therapieansprechen bei HCV-Patienten mit dem Genotyp 1 hat. Allerdings ist auch die geringe Fallzahl (n=34 bei „HCV1/4 0“) innerhalb dieser Patienten-Subgruppe als mögliche Ursache für den fehlenden statistisch signifikanten Einfluss zu diskutieren. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Iwata et al. [136] hingegen weisen auf einen signifikanten Einfluss des V444A-Polymorphismus auf den Therapieerfolg nur bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 2 oder 3 hin, jedoch nicht bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den in unserer Studie erhobenen Daten. Eine mögliche Ursache hierfür stellt die unterschiedliche Zusammensetzung des untersuchten Patientenkollektivs dar. So wurden zum Beispiel in die Studie von Iwata et al. deutlich mehr Patienten mit dem Genotyp 2 oder 3 eingeschlossen als in dieser Studie.

Weiterhin stellt die von Scholtes et al. beschriebene Bedeutung des Farnesoid X Rezeptors für die HCV-Replikation einen Ansatz für neue therapeutische Optionen dar. Mit spezifischen FXR-Antagonisten kann eine Inhibition der Virusreplikation erreicht werden, so dass diese Substanzen in Ergänzung zur bisherigen Therapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin möglicherweise zu einem besseren Therapieansprechen bei Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 führen.

5.3 Der IL28-B-Polymorphismus als Einflussfaktor für den Therapieerfolg

Die Genvariante rs8099917 ist auf dem Chromosom 19 [112] 8 Kilobasen *downstream* vom IL-28B-Gen und 16 Kilobasen *upstream* von IL-28A-Gen [120; 122] lokalisiert. Durch mehrere unabhängige Genom-weite Assoziationsstudien (GWAS) wurde ein signifikanter Einfluss dieses SNPs auf das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion festgestellt [120; 121; 122; 123]. Es konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass HCV-Patienten, die homozygot das als *Response*-Allel definierte T-Allel tragen, signifikant besser auf eine antivirale Therapie ansprechen als Patienten, die homo- oder heterozygot das Risiko-Allel (GG/GT) tragen.

Übereinstimmend mit den publizierten Daten erreichten in unserer Arbeit HCV-Patienten, die homozygot das IL28B-*Response*-Allel aufweisen, signifikant bessere Raten bezüglich ETR und SVR. Der Nachweis, dass IL-28 den vorbeschriebenen Einfluss hat, stellt eine Art der Qualitätskontrolle für die hier durchgeführten Untersuchungen dar. Über diesen Polymorphismus hinaus hat eine Homozygotie für das V444A-Wildtyp-Allel einen zusätzlich verstärkenden Effekt auf eine ETR und eine SVR.

Auf welche Weise der IL-28B-SNP rs8099917 den Therapieerfolg beeinflusst, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden, es existieren diesbezüglich jedoch verschiedene Hypothesen:

Ank et al. [113] stimulierten HepG2-Zellen sowohl mit Interferon- λ 1, Interferon- λ 2, als auch mit Interferon- α . Anschließend erfolgte nach 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden eine Extraktion der zellulären RNA und mittels *real-time PCR* die Bestimmung der mRNA der kodierenden Gene für ISG56, OAS, PKR, Interferon- α , Interferon- β , Interferon- λ 1 und Interferon- λ 2. Interessanterweise konnte nach Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Interferonen sowohl eine verstärkte Expression der Interferon-stimulierten Gene, als auch eine verstärkte Expression von Interferon- λ gemessen werden. Die Expression von Interferon- α oder Interferon- β ließ sich auf diese Weise nicht stimulieren. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die für die Typ III-Interferone kodierenden Sequenzen selbst zu den Interferon-stimulierten Genen gehören.

Marcello et al. [137] inkubierten Huh-7.5 Zellen für 12 Stunden mit Interferon- α oder mit Interferon- α in Kombination mit niedrig dosiertem Interferon- λ . Anschließend wurden diese Zellen mit dem Renilla-Luciferase exprimierenden FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi HCV cell culture virus (HCVcc) infiziert. Nach weiteren 48 Stunden zeigten die Zellen, die mit der Kombination aus Interferon- α und λ inkubiert wurden, eine deutlich geringere Virus-Replikation als die Zellen, die nur mit Interferon- α inkubiert wurden. Aufgrund dieser Daten ist von einem additiven antiviralen Effekt der Typ I- und der Typ III-Interferone auszugehen.

Auf Grundlage der von Marcello [137] und Ank [113] erhobenen Daten kann nun folgender *Feedback*-Mechanismus angenommen werden:

Nach Bindung von Interferon- α an seinen spezifischen Rezeptor wird innerhalb der virusinfizierten Zelle die Interferon-Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende die Bildung der antiviralen Proteine steht. Zusätzlich zu den antiviralen Proteinen wird die Synthese von Interferon- λ stimuliert, welches nach Sekretion zu einer autokrinen Aktivierung des Typ III-Interferon-Rezeptors führt. Da auch die dem Typ-III-Interferon-Rezeptor nachgeschaltete Signalkaskade zu einer vermehrten Expression der antiviralen Proteine führt, kann auf diese Weise die intrazelluläre Konzentration dieser Proteine weiter erhöht werden, der antivirale Effekt wird größer.

Der Polymorphismus rs8099917 scheint diesen *Feedback*-Mechanismus zu beeinflussen. Tanaka et al. [120] und Suppiah et al. [122] konnten zeigen, dass im Vergleich zu Patienten die homo- oder heterozygot für das Risiko-Allel sind, diejenigen Patienten, die das *Response*-Allel homozygot tragen, eine signifikant höhere Expression der Interferon- λ -mRNA und von Interferon- λ selbst aufweisen. Das Vorliegen des Risiko-Allels führt demnach zu einer verminderten Expression antiviraler Proteine und somit zu einer geringeren antiviralen Aktivität der infizierten Zelle. Auch die therapeutische Gabe von pegyliertem Interferon- α zeigt daher bei diesen Patienten einen geringeren antiviralen Effekt als bei den Patienten, die homozygot das *Response*-Allel tragen. Liegt nun gleichzeitig der V444A-Polymorphismus vor, führen die intrazellulär erhöhten Gallensalzkonzentrationen zu einer weiteren Reduktion der Expression und der Aktivität der antiviralen Proteine.

Die Arbeit von Honda et al. [138] liefert einen weiteren Ansatz. Es wurde die basale Expression der Interferon-stimulierten Gene MxA, IFI44 und IFIT1 in Abhängigkeit vom Interleukin-28B-Polymorphismus bei therapienaiven HCV-Patienten untersucht. Interessanterweise kann bei Patienten mit mindestens einem Risiko-Allel eine signifikant höhere basale Expression der ISGs nachgewiesen werden, als bei Patienten, die homozygot für das *Response*-Allel sind. Nach Messung der Spiegel der IL-28B-mRNA mittels RT-PCR fällt eine lineare Korrelation mit den Spiegeln der ISG-mRNA auf. Die Regressionsgerade weist bei Patienten mit dem Risikoallel eine größere Steigung auf, als bei den Patienten mit dem TT-Genotyp. Hier führen demnach geringere IL-28B-Konzentrationen zu einer höheren ISG-Expression.

Die Beobachtung von Honda et al. ist vereinbar mit den Ergebnissen von Chen et al. [139]. Sie untersuchten in ihrer Arbeit das Profil der Genexpression an Lebergewebeproben von therapienaiven HCV-Patienten und gesunden Kontroll-Probanden. Nach Beendigung einer antiviralen Therapie wurden die HCV-Patienten anhand des Therapieansprechens in *Responder* und *Non-Responder* eingeteilt. Patienten, bei denen keine dauerhafte Viruselimination erreicht werden konnte, zeigten eine signifikant höhere basale Expression der Interferon-stimulierten Gene als diejenigen Patienten, die eine SVR erreichten und als die gesunden

Kontrollpatienten. Die Expression der ISGs unterschied sich hingegen nicht signifikant zwischen Kontrollpatienten und *Therapierespondern*.

Feld et al. [140] konnten diese Beobachtung bestätigen, auch in ihrer Studie lag die basale Expression der ISGs bei *Non-Respondern* signifikant höher als bei den *Respondern*. Jedoch konnte bei Patienten, die eine SVR erreichten, nach therapeutischer Gabe von pegyliertem Interferon ein deutlich größerer Anstieg der Expression der Interferon-stimulierten Gene nachgewiesen werden als bei den *Non-Respondern*. Durch diesen größeren Anstieg der ISG-Expression in der *Response*-Gruppe wurde der initial bestehende Unterschied zu den *Non-Respondern* ausgeglichen, die absolute Menge der exprimierten ISGs nach Gabe von pegyliertem Interferon war in beiden Gruppen nahezu gleich. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Gruppe der *Non-Responder* neben der erhöhten basalen Expression der ISGs auch die Expression der Interferon-inhibierenden Proteine wie der Protein Phosphatase 2A (PP2A) vermehrt ist. Der Effekt der weiteren Induktion der antiviralen Interferon-induzierten Gene und Proteine durch pegyliertes Interferon wird durch diese Aktivierung inhibitorischer Signalkaskaden vermindert, eine reduzierte antivirale Interferonwirkung und ein schlechteres Therapieansprechen sind die Folge.

Es scheint demnach nicht die absolute Expression der Interferon-stimulierten Gene für den Therapieerfolg ausschlaggebend zu sein, vielmehr ist das Ausmaß der Interferon-abhängigen Induktion der ISGs entscheidend.

Da wie von Honda et al. [138] beschrieben eine Homozygotie für das T-Allel (*Response*-Allel) des Interleukin-28B-Polymorphismus mit einer geringeren Expression der Interferon-stimulierten Gene einhergeht, ist hier von einer geringeren Aktivierung inhibitorischer Signalwege auszugehen, so dass pegyliertes Interferon bei diesen Patienten einen größeren antiviralen Effekt aufweist und zu einem besseren Therapieansprechen führen kann. Diese Ergebnisse liefern einen interessanten Diskussionsansatz. Die Induzierbarkeit der Interferon-stimulierten Gene beziehungsweise der antiviralen Proteine scheint ausschlaggebend für ein Therapieansprechen zu sein. In diesem Kontext kann anhand der Daten von Honda et al. [138], Feld et al. [140] und Podelvin et al. [124] ein Synergismus zwischen dem

Interleukin-28B-Polymorphismus und dem V444A-Polymorphismus hinsichtlich der Induktion der Interferon-stimulierten Gene postuliert werden. Wie durch Podevin et al. gezeigt, kommt es, eine konstante Interferon-Dosis vorausgesetzt, unter Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit steigenden Gallensalzkonzentrationen zu einer dosisabhängigen Reduktion der Induktion der Interferon-stimulierten Gene. Dies geht einher mit dem in dieser Arbeit nachgewiesenen additiven Effekts des V444A-Polymorphismus und des Interleukin-28B-Polymorphismus auf das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion.

Insgesamt konnte mit dem V444A-Polymorphismus zusätzlich zum Interleukin-28B-Polymorphismus eine weitere Genvariante identifiziert werden, die als unabhängiger Faktor Einfluss auf den Therapieerfolg bei dem Hepatitis C-Virus-Genotyp 1 und 4 hat. Neue therapeutische Ansätze können eventuell in der zusätzlich zur antiviralen Kombinationstherapie durchgeführten medikamentösen Senkung der Gallensalzkonzentration bestehen. Ferner muss die Bedeutung der FXR-Antagonisten als Ergänzung zur antiviralen Therapie geklärt werden. Zusammen mit den bekannten genetischen Varianten innerhalb des SOCS3-Gens [141], der kodierenden Sequenz für das MxA-Protein [142], des OAS-Gens [143], der beta3-Untereinheit des G-Proteins [144] sowie der *Promoter*-Region der für Interferon- γ kodierenden Sequenz [145] stellen die in dieser Studie untersuchten Polymorphismen einen weiteren Schritt zur Individualisierung der antiviralen Therapie auf Grundlage der genetischen Voraussetzungen der Patienten dar.

6. Schlussfolgerung

Für die Entstehung einer Leberzirrhose und das Auftreten der hiermit assoziierten Komplikationen stellt die chronische Infektion mit dem Hepatitis C-Virus einen wichtigen Risikofaktor dar. Eine frühzeitige und erfolgreiche Behandlung der Infektion ist daher von großer Bedeutung. Bislang wurde das Erreichen eines dauerhaften Therapieansprechens durch die eingeschränkte Wirksamkeit der aktuell zur Verfügung stehenden Medikamente deutlich erschwert. Um bereits vor Behandlungsbeginn abschätzen zu können, ob eine antivirale Kombinationstherapie Aussichten auf ein dauerhaftes Therapieansprechen hat, wurden insbesondere klinische Faktoren wie zum Beispiel das Ausmaß eines gegebenenfalls bestehenden Leberschadens, das Patientenalter, aber auch virusspezifische Eigenschaften wie der HCV-Genotyp und die Viruslast berücksichtigt.

In dieser Arbeit konnte der V444A-Polymorphismus der Gallensalzexportpumpe BSEP (rs2287622) als relevanter Einflussfaktor auf das Therapieansprechen bei einer chronischen HCV-Infektion identifiziert werden: Bei einer Homozygotie für das Wildtyp-Allel ist die Wahrscheinlichkeit einer *Therapieresponse* deutlich erhöht. Weiterhin konnten wir zeigen, dass ein additiver Effekt bezüglich des Erreichens eines Therapieansprechens (SVR und ETR) besteht, wenn zusätzlich zum V444A-Wildtyp eine Homozygotie für das T-Allel des IL28B-Polymorphismus rs8099917 vorliegt.

Auf der Grundlage einer Analyse dieser Genvarianten kann unter gleichzeitiger Berücksichtigung der individuellen klinischen Voraussetzungen eines jeden Patienten und der virusspezifischen Eigenschaften eine sehr viel differenzierte Indikationsstellung zur antiviralen Therapie erfolgen. Bei Patienten mit einer ungünstigen genetischen Konstellation sollte vor Einleitung einer Behandlung eine genaue Prüfung des Verhältnisses zwischen nebenwirkungsbedingten Risiken und einem therapieassoziiertem Nutzen im Sinne eines Therapieansprechens durchgeführt werden.

Die Kenntniss der individuellen Ausprägung des V444A-Polymorphismus kann auch die Möglichkeit bieten, mit Hilfe einer entsprechenden Begleitmedikation das Therapieansprechen zu verbessern: Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Homozygotie für den V444A-Polymorphismus eine geringere hepatozelluläre BSEP-Expression aufweisen, dies hat wahrscheinlich eine Erhöhung der intrazellulären Gallensalzkonzentration zur Folge [102; 104]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Gallensalzkonzentrationen innerhalb der Hepatozyten das Interferon-*Signaling* an verschiedenen Stellen beeinflussen [124; 125; 133] und über FXR eine vermehrte Replikation des Hepatitis C-Virus induzieren können [134]. Es ist daher anzunehmen, dass eine medikamentöse Senkung der hepatozellulären Gallensalzkonzentrationen das Therapieansprechen verbessern kann. Substanzen wie Colestyramin, die zu einer Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs und somit zu einer vermehrten intestinalen Ausscheidung von Gallensalzen führen, könnten bei einer Homozygotie für den V444A-Polymorphismus als Begleitmedikation zur antiviralen Therapie einen günstigen Effekt haben. Ebenso ist es möglich, dass mit Hilfe von Substanzen wie Ursodeoxycholsäure, die eine vermehrte Cholerese bewirken, eine Verbesserung des Therapieansprechens erreicht werden kann. Ob diese Medikamente einen signifikanten Effekt auf das Therapieansprechen ausüben muss im Rahmen weiterer Untersuchungen geprüft werden.

7. Quellenverzeichnis

- [01] WHO - Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS* (1999); 6: 35-47.
- [02] Robert Koch Institut - Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland. Virushepatitis B, C und D im Jahr 2008. *EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN* (2009); 20: 189-202.
- [03] Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J - Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *HEPATOLOGY* (2009); 49: 364-377.
- [04] Hoofnagle JH - Course and outcome of hepatitis C. *HEPATOLOGY* (2002); 36: 21-29.
- [05] Häussinger D, Niederau C - Hepatitis C. *BLACKWELL WISSENSCHAFTS-VERLAG*, 2. AKTUALISIERTE UND ERWEITERTE AUSGABE (2001); BERLIN, WIEN.
- [06] Major ME, Feinstone SM. - The molecular virology of hepatitis C. *HEPATOLOGY* (1997); 25: 1527-1538.
- [07] Lauer GM, Walker BD - Hepatitis C virus infection. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* (2001); 345: 41-52.
- [08] Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL - Viral hepatitis C. *LANCET* (2003); 362: 2095-2100.
- [09] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP - The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (2000); 45: 529-538.
- [10] Amin J, Law MG, Bartlett M, Kaldo JM, Dore GJ - Causes of death after diagnosis of hepatitis B or hepatitis C infection: a large community-based linkage study. *LANCET* (2006); 368: 938-945.

- [11] Neil KR, Trent Hepatitis C Study Group, Ramsay S, Thomson BJ, Irving WL - Excess mortality rates in cohort of patients infected with hepatitis C virus: a prospective study. *GUT* (2007); 56: 1098-1104.
- [12] Choo QL, Kou 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: 359-362.
- [13] De Francesco R - Molecular virology of the hepatitis C virus. *JOURNAL OF HEPTOLOGY* (1999); 31 (Suppl. 1): 47-53.
- [14] Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM – Structural biology of hepatitis C virus. *HEPATOLOGY* (2004); 39: 5-19.
- [15] Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T - Molecular biology of hepatitis c virus. *JOURNAL OF GASTROENTEROLGY* (2007); 42: 411–423.
- [16] Tellinghuisen TL, Rice CM - Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY* (2002); 5: 419–427.
- [17] Kopp M, Murray CL, Jones CT, Rice CM - Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2010); 84: 1666–1673.
- [18] Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S - Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2000); 74: 3642-3649.
- [19] Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T - Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *INTERVIROLOGY* (1999); 42: 145–152.
- [20] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Disease – Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. *HEPATOLOGY* (2009); 49: 1335-1374.
- [21] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffmann J, Yu J - Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* (2002); 347: 975-982.
- [22] Mondelli MU, Silini E - Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (1999); 31 (Suppl. 1): 65-70.
- [23] Jacobson IM, Brown RS, Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, Becker S, Wakil AE, Pound D, Godofsky E, Strauss R, Bernstein D, Flamm S, Pauly MP, Mukhopadhyay P, Griffel LH,

Brass CA, WIN-R Study Group - Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *HEPATOLGOGY* (2007); 46: 971-981.

- [24] Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J - Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alfa-2a compared with interferon alfa-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* (2001); 33: 433-438.
- [25] Deuffic-Burban S, Babany G, Lonjon-Domanec I, Deltenre P, Canva-Delcambre V, Dharancy S, Louvet A, Roudot-Thoraval F, Mathurin P - Impact of pegylated interferon and ribavirin on morbidity and mortality in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferases in France. *HEPATOLOGY* (2009); 50: 1351-1359.
- [26] Hoofnagle JH, di Bisceglie AM - The treatment of chronic viral hepatitis. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* (1997); 336: 347-356.
- [27] Fried MW - Side effects of therapy of hepatitis C and their management *HEPATOLOGY* (2002); 36 (Suppl. 1): 237-244.
- [28] Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK - Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *LANCET* (2001); 358 958–965.
- [29] Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG – Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *IMMUNOLOGY LETTERS* (2009); 122: 1–11.
- [30] Haller O, Kochs G, Weber F – The Interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *VIROLOGY* (2006); 344: 119-130.
- [31] Samuel CE - Antiviral actions of interferons. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* (2001); 14: 778–809.
- [32] Haller O, Kochs G - Interferon-induced mx Proteins: dynamin-like GTPases with Antiviral Activity. *TRAFFIC* (2002); 3: 710–717.
- [33] Bode JG, Ludwig S, Erhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D - IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *THE JOURNAL OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* (2003); 17: 488-490.
- [34] Nakayama Y, Plisch EH, Sullivan J, Thomas C, Czuprynski CJ, Williams BR, Suresh M - Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection. *PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE PATHOGENS* (2010); 6: e1000966. doi:10.1371/journal.ppat.1000966.

- [35] Hovanessian AG - On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5' oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS* (2007); 18: 351–361.
- [36] Landolfo S, Gribaudo G, Angeretti A, Gariglio M - Mechanisms of viral inhibition by interferons. *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* (1995); 65: 415-442.
- [37] Haller O, Gao S, von der Malsburg A, Daumke O, Kochs G - Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2010); 285: 28419-28424.
- [38] Rebouillat D, Hovanessian AG - The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: IFN-induced proteins with unique enzymatic properties. *JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH* (1999); 19: 295- 308.
- [39] Naganuma A, Nozaki A, Tanaka T, Sugiyama K, Takagi H, Mori M, Shimotohno K, Kato N - Activation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene by hepatitis C virus core protein. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2000); 74: 8744-8750.
- [40] Lüllmann-Rauch R. - Histologie. *THIEME VERLAG, 1. AUFLAGE* (2003); *STUTTGART*.
- [41] Hofmann AF – Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids; *HEPATOLOGY* (1984); 4 (Suppl. 5): 4S-14S.
- [42] Gavrilkina M – Determinants of biliary bile acid composition in mammals: influence of gender and age. *FALK SYMPOSIUM 108, BILE ACIDS AND CHOLESTASIS* (1998); 48: 29-41.
- [43] Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F - Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE* (2004); 25: 221–360.
- [44] Meier PJ - Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (1995); 269: 801–812.
- [45] Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA - Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1998); 273: 34691–34695.
- [46] Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B - Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (1998); 274: 370–375.
- [47] Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B, 1997. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *HEPATOLOGY* (1997); 26, 1667–1677.

- [48] Suzuki H, Sugiyama Y - Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver. *SEMINARS IN LIVER DISEASE* (2000); 20, 251–263.
- [49] Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW - Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion / HCO₃-exchange. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1997); 272, 26340–26345.
- [50] Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N - Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1998); 273: 16184–16191.
- [51] Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H - Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1999); 274: 17159–17163.
- [52] König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D - Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2000); 275: 23161–23168.
- [53] Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B – Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *GASTROENTEROLOGY* (2001); 120: 525-533.
- [54] Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart, CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ - Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *GASTROENTEROLOGY* (1995); 109: 1274–1282.
- [55] Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD - Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (2001); 283: 417–422.
- [56] Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, Endou H - Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEDERATION OF THE SOCIETIES OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY LETTERS* (1998); 429: 179–182.
- [57] Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H - Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *NATURE* (1994); 372: 549–552.
- [58] Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM - Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* (1997); 51: 913–921.

- [59] Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P - Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *CANCER RESEARCH* (1997); 57: 3537–3547.
- [60] König J, Rost D, Cui Y, Keppler D - Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *HEPATOLOGY* (1999); 29: 1156–1163.
- [61] Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeis J, Jedlitschky G, Keppler D -. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *HEPATOLOGY* (2003); 38: 374–384.
- [62] Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D - The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2000); 275, 30069–30074.
- [63] Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ, Stieger B - Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* (2000); 57, 634–641.
- [64] Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ - Hepatic Transport of Bile Salts. *SEMINARS IN LIVER DISEASE* (2000); 20: 273-292.
- [65] Esteller A - Physiology of bile secretion. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* (2008); 14: 5641-5649.
- [66] Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I - Genetic analysis of the multidrug transporter. *ANNUAL REVIEW OF GENETICS* (1995); 29: 607–649.
- [67] van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, Giaccone G - Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* (1993); 67: 284–289.
- [68] Ruetz S, Gros P - Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *CELL* (1994);77: 1071–1081.
- [69] van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G - MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *CELL* (1996); 87: 507–517.
- [70] Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D - cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1996); 271: 15091–15098.

- [71] Gerk PM, Vore M - Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* (2002);302: 407–415.
- [72] Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V - Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *CANCER RESEARCH* (1995); 55: 2029-2034.
- [73] Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ - The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1998); 273: 10046-10050.
- [74] Dawson PA, Lan T, Rao A - Bile acid transporters. *JOURNAL OF LIPID RESEARCH* (2009); 50: 2340-2357.
- [75] St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ - Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY* (2001); 204: 1673–1686.
- [76] Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Anell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ - A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *NATURE GENETICS* (1998); 20: 233-238.
- [77] Arrese M, Ananthanarayanan M - The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (2004); 449: 123–131.
- [78] Dean M, Hamon Y, Chimini G - The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *JOURNAL OF LIPID RESEARCH* (2001); 42: 1007-1017.
- [79] Stieger B, Meier Y, Meier PJ - The bile salt export pump. *EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (2007); 453: 611–620.
- [80] 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.
- [81] Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krikken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Grouw A, Van Goor H, Thompson RJ, Müller M – Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *GASTROENTEROLOGY* (1999);117: 1370–1379
- [82] Pauli-Magnus C, Meier PJ - Hepatocellular transporters and cholestasis. *JOURNAL OF CLINICAL GASTROENTEROLOGY* (2005); 39: 103–110.

- [83] Van Mil SW, Van Der Woerd WL, Van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, Van Den Berg IE, Berger R, Houwen RH, Klomp LW - Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *GASTROENTEROLOGY* (2004); 127: 379–384.
- [84] Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, Zoda-Marin T, Jung D, Breymann C, Zimmermann R, Kenngott S, Beuers U, Reichel C, Kerb R, Penger A, Meier PJ, Kullak-Ublick GA – Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *PHARMACOGENETICS* (2004); 14: 91-102.
- [85] Dixon PH, Van Mil SW, Chambers J, Strautnieks SS, Thompson RJ, Lammert F, Kubitz R, Keitel V, Glantz A, Mattsson LA, Marschall HU, Molokhia M, Moore GE, Linton KJ, Williamson C – Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *GUT* (2009); 58: 537-544.
- [86] 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. *PHARMACOGENETICS AND GENOMICS* (2007);17:47–60.
- [87] Higuchi H, Gores GJ - Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (2003); 284: 734–738.
- [88] Ananthanarayana M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ - Human BSEP promoter is transactivated by the farnesoid X receptor / bile acid receptor. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2001); 276: 28857-28865.
- [89] Honjo Y, Sasaki S, Kobayashi Y, Misawa H, Nakamura H - 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor. *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* (2006); 188: 635–643.
- [90] Wang L, Boyer JL - The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *HEPATOLOGY* (2004); 39: 892–899.
- [91] Anwer MS - Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *HEPATOLOGY* (2004); 39: 581–590.
- [92] Kubitz R, Sütfels G, Kuhlkamp T, Kolling R, Häussinger D - Trafficking of the bile salt export pump from the golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *GASTROENTEROLOGY* (2004); 126: 541–553.
- [93] St-Pierre MV, Dufour JF, Arias IM - Disruption of actin organization by cytochalasin D does not impair biliary secretion of organic anions in the rat. *HEPATOLOGY* (1997);25: 970–975.
- [94] Gatmaitan ZC, Nies AT, Arias IM - Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* (1997); 272: 1041–1049.

- [95] Misra S, Varticovski L, Arias IM - Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY* (2003); 285: 316-324.
- [96] Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV - Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *HEPATOLOGY* (2001) ;33: 1223-1231.
- [97] Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL - Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *GASTROENTEROLOGY* (2000); 118: 163–172.
- [98] Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Häussinger D - Regulation of the dynamic localization of the rat BSEP gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *HEPATOLOGY* (2001); 33: 509–518.
- [99] Kipp H, Arias IM - Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY* (2002); 64: 595–608.
- [100] Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom Dahl S, Häussinger D - Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *GASTROENTEROLOGY* (2001); 121: 407–419.
- [101] Kubitz R, Saha N, Kühlkamp T, Bettermann K, Vom Dahl S, Häussinger D - Ca^{2+} -dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2004); 279: 10323–10330.
- [102] Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, Nussler N, Eichelbaum M, Meier PJ, Stieger B – Interindividual variability of ATP-binding-cassette (ABC)-transporter Expression in human liver. *HEPATOLOGY* (2006): 44; 62-74.
- [103] Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, Lang T, Anwald B, Kullak-Ublick GA, Beuers U, Meier PJ – BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy caucasians, primary biliary cirrhosis and primary biliary cholangitis. *HEPATOLOGY* (2004); 39: 779-791.
- [104] Meyer Y, Zudan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Stieger B, Pauli-Magnus C - Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of 1331 T>C polymorphism in the bile salt export pump. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* (2008); 14: 38-45.
- [105] Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ - Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *GASTROENTEROLOGY* (2004); 126: 322-342.
- [106] Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL – Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep / Abcb11) correlate with severity of cholestatic disease. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. CELL PHYSIOLOGY* (2007); 293: 1709-1716.

- [107] Pauli-Magnus C, Meier PJ, Stieger B – Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *SEMINARS IN LIVER DISEASE* (2010); 30: 149-159.
- [108] Stieger B – Recent insights into the function and the regulation of the bile salt export pump (ABCB11). *CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY* (2009); 20: 176-181.
- [109] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldemann B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant F, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM – IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *NATURE IMMUNOLOGY* (2003); 4: 63-68.
- [110] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP – IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *NATURE IMMUNOLOGY* (2003); 4: 69-77.
- [111] Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K – IL-28A, IL-28B and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS* (2010); 21: 237-251.
- [112] Uze G, Monneron D – IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *BIOCHIMIE* (2007); 89: 729-734.
- [113] Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR – Lambda Interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and display potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2006); 80: 4501-4509.
- [114] Pagliaccetti NE, Robek MD – Interferon- λ in HCV infection and therapy. *VIRUSES* (2010); 2:1589-1602.
- [115] Li M, Liu X, Zhou Y, Su S – Interon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune response. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* (2009); 86: 23-32.
- [116] Commins S, Steinke JW, Borish L, The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (2008); 121: 1208-1211.
- [117] Donnelly RP, Kotenko SV – Interferon-lambda: a new addition to an old family. *JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH* (2010); 30: 555-564.
- [118] Robek MD, Boyd BS, Chisari FV – Lambda interferon inhibits hepatitis b and c virus replication. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2005); 79: 3851-3854.
- [119] Miur AJ, Shiffman ML, Zaman A, Yoffe B, de la Torre A, Flamm S, Gordon SC, Marotta P, Vierling JM, Lopez-Talavera JC, Byrnes-Blake K, Fontana D, Freeman J, Gray T, Hausman D, Hunder NN, Lawitz E – Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without

ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis c virus infection. *HEPATOLOGY* (2010); 52: 822-32.

- [120] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M – Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis c. *NATURE GENETICS* (2009); 41: 1105-1109.
- [121] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Miur AJ, Sulkowski M, McHutchinson JG, Goldstein DB – Genetic variation in IL28B predicts hepatitis c treatment-induced viral clearance. *NATURE* (2009); 461: 399-401.
- [122] Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J – IL2B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *NATURE GENETICS* (2009); 41: 1100-1105.
- [123] Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Müller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PF – Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis c and treatment failure: a genome-wide association study. *GASTROENTEROLOGY* (2010); 138: 1338-1345.
- [124] Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R - Bile acids modulate the interferon signaling pathway. *HEPATOLOGY* (1999); 29: 1840-1847.
- [125] 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. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* (2004); 101: 8733-8738.
- [126] Byrne J, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, Mieli-Vergani G, Thompson RJ – Missense mutations and single nucleotide Polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *HEPATOLOGY* (2009); 49: 553–567.
- [127] Keitel V, Burdelski M, Vojnisek Z, Schmitt L, Häussinger D, Kubitz R - De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis. *HEPATOLOGY* (2009) ;50: 510-517.
- [128] Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, Knoefel WT, Kubitz R, Häussinger D – The membrane-bound bile acid transporter TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *HEPATOLOGY* (2009); 50: 861-870.
- [129] Delgado M – Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10 and

- inducible nitric-oxide synthase expression. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2003); 278: 27620-27629.
- [130] Kanda N, Watanabe S – 17beta-estradiol inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa by human keratinocytes. *JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* (2003); 120: 411-419.
- [131] Lee EH, Rikihisa Y – Protein kinase A-mediated inhibition of gamma-interferon-induced tyrosine phosphorylation of janus kinases and latent cytoplasmic transcription factors in human monocytes by *Ehrlichia chaffeensis*. *INFECTION AND IMMUNITY* (1998); 66: 2514-2520.
- [132] David M, Petricoin E, Lerner AC - Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1996); 271: 4585-4588.
- [133] Graf D, Haselow K, Munks I, Bode JG, Häussinger D - Inhibition of interferon-alpha-induced signaling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids. *BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2010); 391: 1175-1187.
- [134] Scholtes C, Diaz O, Icard Y, Kaul A, Bartenschläger R, Lotteau V, Andre P - Enhancement of genotype 1 hepatitis c virus replication by bile acids through FxR. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (2008); 48: 192-199.
- [135] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C – Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites *CELL* (1995); 81: 687-693.
- [136] Iwata R, Stieger B, Mertens JC, Müller 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. *JOURNAL OF VIRAL HEPATITIS* (2011); 18: 768-778.
- [137] Marcello T, Grakoui A, Barba-Paeth G, Machlin ES, Kotenko SV, Macdonald MR, Rice CM - Interferons- α and λ inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *GASTROENTEROLOGY* (2006); 131: 1887-1898.
- [138] Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S - Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *GASTROENTEROLOGY* (2010); 139: 499-509.
- [139] Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID - Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *GASTROENTEROLOGY* (2005); 128: 1437-1444.

- [140] Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, Pusek SN, Schweigler LM, Theodore D, Zacks SL, Liang TJ, Fried MW - hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *HEPATOLOGY* (2007); 46: 15488-1563.

- [141] Persico M, Capasso M, Russo R, Persico E, Croce L, Tiribelli C, Iolascon A – Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *GUT* (2008); 57: 507-515.

- [142] Hijikata M, Mishiro S, Myiamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y - Genetic polymorphism of the MxA gene promotor and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *INTERVIROLOGY* (2001); 44: 379-382.

- [143] Su X, Yee L, Im K, Rodes SL, Tang Y, Tong X, Howell C, Ramcharan D, Rosen HR, Taylor MW, Liang TJ, Yang H - Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (2008); 49: 184-191.

- [144] Sarrazin C, Berg T, Weich V, Müller T, Frey U, Zeuzem S, Gerken G, Roggendorf M, Siffert W - GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa / ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection. *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (2005); 43: 388-393.

- [145] Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Tong X, Tang G, Howell CD, Rosen HR, Thio CL, Thomas DL, Alter HJ, Sapp RK, Liang TJ - A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* (2007); 104: 985-990.

8. Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, den 11.02.2014

Christoph Hermann Brinkmeyer

9. Danksagung

Meiner Familie danke ich für die großartige Unterstützung zu jeder Zeit. Dank gilt auch meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ralf Kubitz für die hervorragende Betreuung beim Anfertigen dieser Arbeit.