

Aus der Medizinischen Klinik II

der Universitätsklinik Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Hermann

Einsele

**Bedeutung eines spezifischen Genpolymorphismus (IL28B) für die
Verträglichkeit einer Interferontherapie bei Patienten mit chronischer
Hepatitis-C-Infektion.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von

Jonas Bauer

aus Erlenbach

Würzburg, August 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Dölken

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2019

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern Irmtrud und Peter Bauer

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeines zur Hepatitis-C-Infektion	1
1.1.1	Das Hepatitis-C-Virus	1
1.1.2	Epidemiologie der chronischen Hepatitis-C-Infektion	1
1.1.3	Transmission und Risikofaktoren	2
1.1.4	Verlaufsformen und klinische Manifestationen der Hepatitis-C-Infektion	2
1.2	Therapiemöglichkeiten einer chronischen Hepatitis-C-Infektion	4
1.2.1	Zielsetzung der antiviralen Therapie	4
1.2.2	Beurteilung des virologischen Ansprechens unter Therapie: Definitionen	5
1.2.3	Beurteilung des virologischen Ansprechens nach Therapieende	5
1.2.4	Historische Ursprünge der antiviralen Therapie, klassische interferonbasierte Behandlungsmöglichkeiten sowie moderne interferonfreie antivirale Kombinationstherapien	6
1.2.5	Bedeutung und Wirkmechanismen der Interferone	7
1.2.6	Empfehlungen, Kontraindikationen und prognostische Faktoren einer interferonbasierten, antiviralen Kombinationstherapie	7
1.3	Therapieinduzierte Nebenwirkungen	9
1.3.1	Nebenwirkungsprofil der antiviralen Kombinationstherapie	9
1.3.2	Ursachen der psychiatrischen Nebenwirkungen von Interferon alpha	12
1.3.3	Bedeutung der genetischen Variation in IL28B für die Ansprechraten einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis C-Infektion	13
1.4	Bedeutung der genetischen Variation in IL28B für die Ansprechraten einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis-C-Infektion	14
1.4.1	Allgemeine Erläuterung des Begriffes Single Nucleotide Polymorphismus (SNP)	14
1.4.2	Details zum SNP im Bereich des IL28B Gens	14

1.4.3	Konsequenzen der unterschiedlichen Genotypenverteilung von IL28B für die basale Virusreplikation, die natürliche körpereigene Viruselimination sowie die Sustained Virological Response (SVR)	<u>15</u>
1.5	Zielsetzungen der Studie	<u>16</u>
2.	Patienten und Methoden	<u>18</u>
2.1	Studiendesign und Patientenkollektiv	<u>18</u>
2.1.1	Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung (TAP)	<u>19</u>
2.1.1.1	Subtest Alertness	<u>20</u>
2.1.1.2	Subtest Vigilanz/Daueraufmerksamkeit	<u>21</u>
2.1.2	Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)	<u>21</u>
2.2	Materialien und molekularbiologische Methoden	<u>23</u>
2.2.1	Materialien	<u>23</u>
2.2.1.1	Geräte	<u>23</u>
2.2.1.2	Verbrauchsmaterialien	<u>24</u>
2.2.1.3	Chemikalien	<u>24</u>
2.2.1.4	Kommerzielle Kits	<u>25</u>
2.2.1.5	Primer	<u>26</u>
2.2.1.6	Standardlösungen	<u>26</u>
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	<u>26</u>
2.2.2.1	DNA-Isolierung aus Patientenblut	<u>26</u>
2.2.2.1.1	DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood and Tissue Kit	<u>27</u>
2.2.2.1.2	Messung der DNA-Konzentration mittels Photometer	<u>27</u>
2.2.2.2	PCR-Durchführung mittels Fail Safe PCR PreMix Selection Kit	<u>28</u>
2.2.2.3	Aufarbeitung des PCR-Produktes mittels PCR-Purification- Kit	<u>31</u>
2.2.2.4	PCR-Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese	<u>31</u>
2.2.2.5	Vorbereitung der PCR- DNA- Produkte für die Sequenzierung bei LGC	<u>32</u>
2.2.2.6	Sequenzierung	<u>32</u>
2.2.3	Statistische Methoden: Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	<u>33</u>

3.	Ergebnisse	34
3.1	Sequenzierung und statistische Auswertung der Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs	34
3.2	Dauerhaftes virologisches Ansprechen/SVR- Raten der verschiedenen Genotypvarianten des SNP rs 12979860 im Würzburger Patientenkollektiv	48
3.3	Zusammenhang zwischen der interferonassoziierten depressiven Symptomatik und den drei untersuchten genetischen Polymorphismen	49
3.4	Zusammenhang zwischen den interferonassoziierten Veränderungen der Reaktionszeiten in der TAP und den drei untersuchten genetischen Polymorphismen	53
4.	Diskussion	57
4.1	Fehlerquellen und Optimierungsansätze der DNA-Sequenzierung mittels herkömmlicher PCR-Methode nach Sanger	57
4.2	Gründe für die Umstellung auf den Fail Safe PCR Enzyme Mix	58
4.3	Bewertung der Würzburger Studie hinsichtlich eines für die mitteleuropäische Gesamtbevölkerung repräsentativen Patientenkollektivs	60
4.4	Diskussion des Zusammenhangs zwischen Genpolymorphismus und Ansprechen der interferonbasierten antiviralen Hepatitis-C-Behandlung	62
4.5	Diskussion des Zusammenhangs zwischen Genpolymorphismus und dem Nebenwirkungsprofil einer interferonbasierten, antiviralen Hepatitis-C-Behandlung und Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Studien	62
4.6	Diskussion des Zusammenhangs zwischen den therapieassoziierten Nebenwirkungen und dem dauerhaften Therapieansprechen	65

5.	Ausblick: Interferonfreie, antivirale Therapieoptionen	67
6.	Zusammenfassung	70
7.	Anhang	71
7.1	Ethikvotum	71
7.2	Patientenaufklärung	71
7.3	Einwilligungserklärung	74
7.4	Literaturverzeichnis	75
7.5	Abbildungsverzeichnis	95
7.6	Tabellenverzeichnis	97
8.	Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zur Hepatitis-C-Infektion

1.1.1 Das Hepatitis-C-Virus

Bei dem 1989 erstmals entdecktem Hepatitis-C-Virus (HCV) handelt es sich um ein 50-60nm großes hepatotrophes Einzelstrang(+)-RNA-Virus, welches der Gattung Hepacivirus der Familie der Flaviviren zugeordnet wird (1, 2).

Durch mangelnde Reparaturmechanismen, fehlerhafte Replikasen sowie mangelnde Präzision der HCV-RNA-Polymerase mit konsekutiv nahezu 2×10^3 Mutationen pro Nukleotidposition (3) besitzt das HCV eine ausgeprägte genetische Heterogenität.

Die 6 Genotypen und mehr als 90 Subtypen des HCV zeigen deutliche geographische Differenzen bezüglich ihrer Verteilung (2). Während die HCV Genotypen 1-3 weltweit verbreitet sind, werden die Genotypen 4-6 nur in speziellen Regionen gefunden: Typ 4 in Nord- und Zentral-Afrika, Typ 5 in Süd-Afrika und Typ 6 in Hong-Kong beziehungsweise in Vietnam (3). In der nordamerikanischen sowie europäischen Bevölkerung ist der Genotyp 1 vorherrschend, wobei in Deutschland derzeit der Subtyp 1b am häufigsten zu finden ist (2, 4, 5). Tendenziell lässt sich inzwischen allerdings eine Verlagerung zugunsten des Genotyps 1a bei jungen HCV-Infizierten beobachten (6).

1.1.2 Epidemiologie der chronischen Hepatitis-C-Infektion

Mit insgesamt 130 bis 170 Millionen (2,2-3% der Weltbevölkerung) infizierten Menschen stellt die Hepatitis-C-Infektion heutzutage die meist verbreitete und bedeutendste chronische Infektionskrankheit weltweit dar (7, 1). Bei den Seroprävalenzraten zeigen sich allerdings deutliche Unterschiede: insbesondere in Großbritannien und Skandinavien (0,01- 0,1%), aber auch in Nordamerika, Westeuropa, Australien und Südafrika (0,2- 0,5%) finden sich sehr niedrige Werte. Mittelhohe HCV-Prävalenzen konnten für einige Teile Osteuropas, Länder des Mittelmeerraumes sowie im Mittleren Osten, in Indien und auch Brasilien nachgewiesen werden. Extrem hohe Seroprävalenzen zeigen sich in Pakistan (5-44%), Ägypten (17-26%) sowie einigen

anderen Regionen Afrikas und Asiens wie zum Beispiel in Hubei oder auch in der Mongolei (8, 9).

1.1.3 Transmission und Risikofaktoren

Die Infektion mit dem HCV erfolgt in erster Linie durch parenterale Übertragung. Während seit Ende des Zweiten Weltkrieges bis zur Einführung standardisierter Tests (z.B. anti-HCV-Screening von Blutspendern) Ende der 80er Jahre kontaminiertes Blut, Blutprodukte oder Organtransplantationen noch die mit Abstand größte Risikoquelle darstellten, ist die Ansteckungsgefahr mit 3 von 10 000 Transfusionen seither deutlich gefallen (7, 10). Dennoch zeigen Patienten unter chronischer Hämodialyse-Behandlung mit Infektionsraten von bis zu 60 % deutlich höhere Hepatitis-C-Prävalenzen als die nicht dialysepflichtige Allgemeinbevölkerung (11, 12).

Bedeutsamster Risikofaktor mit HCV-Serumprävalenzraten von über 80% bei Langzeitabhängigen stellt der intravenöse Drogenabusus dar (13). Viel seltener als lange Zeit angenommen sind der sexuelle Kontakt mit HCV-Infizierten beziehungsweise die vertikale Transmission bei perinataler Virusexposition der Krankheitsauslöser (12). Übertragungen des HCV im Zuge des Stillens sowie nicht-sexuelle intrafamiliäre Übertragungen werden nur in Ausnahmefällen beobachtet (14). Weitere zu erwähnende Risikofaktoren stellen die berufliche Exposition (z.B. Nadelstichverletzungen), Virusübertragungen durch Piercen beziehungsweise Tätowieren, Akupunktur mit kontaminierten Instrumenten oder alltägliche Verletzungen mit kontaminierten Rasierapparaten/Zahnbürsten dar.

1.1.4 Verlaufsformen und klinische Manifestationen der Hepatitis-C-Infektion

Bei der Hepatitis-C-Infektion unterscheidet man eine akute und eine chronische Verlaufsform. Die akute Hepatitis-C-Infektion ist definiert als eine „vor weniger als 6 Monaten erworbene Infektion mit dem HCV. Sie kann mit einer Erhöhung der Aminotransferase-Aktivität („Transaminasen“) einhergehen und zu einer Leberfunktionseinschränkung führen“ (15). Die Akutphase der Infektion verläuft meist symptomlos oder symptomarm. Zu den unspezifischen und zum Teil grippeähnlichen Symptomen zählen allgemeine Abgeschlagenheit, erhöhte Körpertemperatur,

Müdigkeit, Nausea, Vomitus, Gelenkschmerzen, Druck- und Spannungsgefühl im rechten Oberbauch sowie Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust. Des Weiteren kann es zu einer Dunkelfärbung des Urins beziehungsweise zu lehmfarbenem Stuhl kommen (16). Bis zu 85% der Infizierten erleiden eine Chronifizierung, eine länger als 6 Monate fortbestehende Infektion mit dem HCV (HCV-RNA positiv), welche analog zur Akutinfektion klinisch meist inapparent verläuft oder mit relativ unspezifischen Begleitsymptomen wie Anorexie, Übelkeit, abdominellen Beschwerden oder Müdigkeit einhergeht (17). Als Langzeitfolge entwickelt etwa jeder Fünfte eine Leberzirrhose und davon wiederum jährlich 1-4% ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) (18, 19). Die Zeitspanne zwischen dem infizierenden Viruskontakt und dem Auftreten der Komplikationen beträgt für eine Leberzirrhose im Durchschnitt 13-25 Jahre, für die Entwicklung eines HCC 17-31 Jahre (20).

Insgesamt zählt die Hepatitis-C-Infektion damit zu den Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen und primäre Leberzelltumoren (17). Das Risiko scheint auch nach erfolgreicher antiviraler Behandlung erhöht zu bleiben (21). Weltweit lassen sich 27% der Zirrhose- und 25% der HCC-Entwicklungen auf die chronische Infektion mit HCV zurückführen (22). Verglichen mit der Allgemeinbevölkerung weisen Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion ein signifikant erhöhtes leberbezogenes Mortalitätsrisiko auf (23, 24, 25).

Statistische Auswertungen machen deutlich, dass neben der Lebensdauer auch die Lebensqualität signifikant vermindert ist. 35-68% der HCV-Infizierten fühlen sich überdurchschnittlich müde, abgeschlagen und vermindert leistungsfähig. Beeinträchtigungen des peripheren und zentralen Nervensystems, kognitive sowie psychomotorische Störungen bis hin zu depressiven Symptomen können festgestellt werden (15, 26-31).

Des Weiteren kommt es bei einem Großteil der Hepatitis-C-Patienten zum Auftreten von mindestens einer extrahepatischen Manifestation (32, 33). Dieser Zusammenhang beruht wahrscheinlich auf immunologischen, hämatologischen und lymphoproliferativen Prozessen (34).

Am häufigsten treten dabei gemischte Kryoglobulinämien mit dermalen, nervalen, nephrologischen sowie rheumatologischen Komplikationen auf. Zahlreiche weitere Krankheitsbilder wie zum Beispiel Vaskulitiden, Prophyria cutanea tarda oder Sicca-

Syndrom stehen in Zusammenhang mit einer Hepatitis-C-Infektion. Deutlich seltener wurden beispielsweise Non-Hodgkin-Lymphome, Thrombozytopenien oder Diabetes mellitus Typ II-Erkrankungen im Krankheitsverlauf beobachtet (35).

1.2 Therapiemöglichkeiten einer chronischen Hepatitis-C-Infektion

1.2.1 Zielsetzung der antiviralen Therapie

Das Hauptziel der antiviralen Therapie ist die vollständige Elimination des Hepatitis-C-Virus (messbar als fehlende Nachweisbarkeit von HCV-RNA in hochsensitiven serologischen Assays), welche mit einer deutlichen Senkung von Morbidität, Mortalität und Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms einhergeht (15).

Weitere therapeutische Ziele stellen die Behandlung der extrahepatischen Manifestationen sowie in Einzelfällen die Beseitigung der Infektiosität sowie die Verbesserung der Lebensqualität dar (36, 37).

1.2.2 Beurteilung des virologischen Ansprechens unter Therapie: Definitionen

Definitionen des virologisches Ansprechens	Therapiedauer (Wochen)	HCV-RNA
Rapid Virological Response (RVR)	4	<50 IU/ml
Early Virological Response (EVR)	12	<30 000 IU/ml oder Abfall >2log10 Stufen
Complete EVR (cEVR)	12	<50 IU/ml
Slow Virological Response (SVR)	12	<30 000 IU/ml oder Abfall >2log10 Stufen
	und 24	Persistenz <50 IU/ml
Break Through (BT)	unabhängig	Anstieg >1log10 Stufe bzw. erneuter Nachweis nach zwischenzeitl. Negativität
Non Response (NR)	12	Abfall <2log10 Stufen
	und 24	Persistenz

Tabelle Nr. 1: Beurteilung des virologischen Ansprechens unter Therapie: Tabellarische Auflistung der Definitionen

1.2.3 Beurteilung des virologischen Ansprechens nach Therapieende

Seit Einführung hochsensitiver PCR Assays zur Detektion viraler RNA wird ein erfolgreiches Therapieansprechen durch die SVR definiert, was einer HCV-RNA-Konzentration <50IU/ml nach einer 24 wöchigen therapiefreien Periode entspricht. Wird dieses Ziel erreicht, ist die Wahrscheinlichkeit eines späteren Rückfalls mit 1-2% sehr gering, sodass man von einem dauerhaften Therapieansprechen ausgehen kann.

Ein Rückfall liegt vor bei „fehlender Nachweisbarkeit der HCV-RNA im Blut mit einem sensitiven Assay zum Therapieende gefolgt von einem positiven HCV-RNA-Befund nach Therapieende.“ Histologisch korrelieren die Abnahme oder fehlende Progression des Fibrorestadiums sowie eine verminderte entzündliche Aktivität mit einem positiven Therapieansprechen (15).

1.2.4 Historische Ursprünge der antiviralen Therapie, klassische interferonbasierte Behandlungsmöglichkeiten sowie moderne interferonfreie antivirale Kombinationstherapien

Erste klinische Erfolge der Interferontherapie zeigten sich 1986 bei Patienten mit Non-A-Non-B-Hepatitis (38). Nach Identifizierung des Hepatitis-C-Virus 3 Jahre später konnten diese Resultate in mehreren Studien bestätigt werden (39, 40). Die zunächst noch niedrigen SVR-Raten sowie hohen Relapsraten konnten in den darauffolgenden zwei Jahrzehnten durch Veränderung von Therapiedosis und -dauer der Interferonmonotherapie schrittweise optimiert werden (41, 42). Den nächsten Meilenstein stellte der Wandel zur interferonbasierten Kombinationstherapie dar. Durch Hinzunahme von Ribavirin konnten die SVR-Raten deutlich gesteigert (Genotyp 2,3 ca. 65%, Genotyp 1 ca. 30% je nach Therapiedauer) und die Relapsraten weiter gesenkt werden (43-46). Die Erweiterung zur Triple-Therapie mit Amantadin erbrachte hinsichtlich der SVR-Raten unterschiedliche Studienergebnisse, konnte aber zumindest bezüglich der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (vor allem im Bereich Müdigkeit und Kraft) sowohl die interferonbasierte Mono- als auch die Kombinationstherapie mit Ribavirin signifikant bessern (47-51).

Die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Interferone zu pegylierten Interferonen mit verlängerten Halbwertszeiten (60-80 statt zuvor 8 Stunden) ermöglichte die Reduktion auf eine einwöchige Dosierung. Hierdurch wurde nicht nur die Behandlungseffektivität, sondern auch die SVR-Rate kontinuierlich gesteigert (52, 53, 54). Insgesamt entwickelte sich die Kombination aus pegyliertem Interferon und Ribavirin zur Standardbehandlung.

Der letzte Quantensprung ergab sich durch die Entwicklung einer Vielzahl direkt antiviraler Substanzen, welche die Virusreplikation an unterschiedlichen Angriffspunkten behindern (erstmaliger Wirkungsnachweis im Menschen 2003). Je nach Genotyp werden sie in diversen zweier- bzw. dreier- Kombinationen (zum Teil mit Ribavirin kombiniert) angeboten und stellen inzwischen die erste Wahl bei der HCV-Therapie dar. Dank dieser modernen Therapieoptionen konnten bei chronischen HCV-Infizierten sowohl die Relapsraten als auch die SVR-Raten bei guter Verträglichkeit und trotz verkürzter Behandlungsdauer nochmals deutlich verbessert werden. Bezüglich

einer akuten Infektion konnten bis zu 100% Heilungsraten für Patienten mit HCV-Genotyp 1 erreicht werden (siehe Erläuterungen im Ausblick) (55).

1.2.5 Bedeutung und Wirkmechanismen der Interferone

Bei Interferonen handelt es sich um körpereigene Proteine (Zytokine), die als wichtiger Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr als zelluläre Mediatoren in der autokrinen sowie parakrinen Signalvermittlung fungieren. Bei der Behandlung der chronischen Hepatitis-C-Infektion spielt IFN alpha die entscheidende Rolle. Zu diesem Subtyp zählen mehr als 22 strukturverwandte Proteine die von 14 verschiedenen Genen des Chromosoms 9 kodiert werden. Wenngleich der molekulare Wirkmechanismus der Interferone noch nicht vollständig geklärt ist, gilt der regulierende Einfluss der Interferone auf die Gentranskription als gesichert: Durch Bindung der Interferone an spezielle membranständige Rezeptorkomplexe auf der Zielzelle wird eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt. Nach Aktivierung rezeptorassoziierter Tyrosinkinase sowie spezifischer STAT-Proteine (signal transducers and activators of transcription) bildet sich ein Komplex, welcher als Transkriptionsfaktor schließlich die Expression IFN-stimulierter Gene initiiert. Diese stellen die Grundlage der antiviralen (direkte Inhibition der Virusreplikation durch Induktion verschiedener Enzyme wie 2',5'-Oligoadenylatsynthetase oder Proteinkinase R, Hemmung der Proteinsynthese, Abbau von Nukleinsäuren), wachstumshemmenden (Hemmung der Zellproliferation) sowie immunmodulierenden (gesteigerte Expression von MHC-I-Molekülen, Aktivierung von Immunmodulatoren wie natürliche Killerzellen, TH1-Helferzellen sowie Makrophagen) Wirkungsweise dar (56-66).

1.2.6 Empfehlungen, Kontraindikationen und prognostische Faktoren einer interferonbasierten, antiviralen Kombinationstherapie

Die leitlinienorientierte Hepatitis-C-Behandlung konzentrierte sich auf die häufigsten Genotypen 1, 2 und 3. Für die anderen Genotypen 4, 5 und 6 lagen keine gesonderten Daten vor, sodass ein analoges Vorgehen wie bei Genotyp 1 nahegelegt wurde.

Aufgrund genotypübergreifend verbesserten SVR-Raten, niedrigeren Therapieabbruchraten sowie besserer Verträglichkeit (geringere Rate an grippeartigen Beschwerden, Myalgien, depressiven Symptomen) der pegylierten Variante des

Interferon alpha empfahl die S3 Leitlinie eine Kombinationstherapie aus Peginterferon alpha plus Ribavirin (67-72). Je nach Genotyp wurde nochmals zwischen niedrigdosiertem Ribavirin für 24 Wochen bei Typ 2 und 3 beziehungsweise hochdosiertem oder körperlsgewichtsadaptiertem Ribavirin für 48 Wochen (in einigen Studien zusätzlich auch kombiniert mit einer gesteigerten Peginterferon alpha-Dosierung) bei therapieresistenterem Typ 1, hoher Ausgangsviruslast beziehungsweise Körpergewicht über 85 kg differenziert (73, 74). Diese Leitlinienempfehlungen wurden genotypübergreifend im Falle einer HCV-RNA-Negativität nach vier Wochen antiviraler Therapie sowie einer niedrigen prätherapeutischen Viruslast (< 600.000 IU/ml) bei Genotyp 1 studienbasiert modifiziert. In diesen Fällen zeigte eine Behandlungsverkürzung auf 24 Wochen bei Genotyp 1 beziehungsweise auf 12 Wochen bei Genotyp 2 und 3 keine negativen Auswirkungen im Therapieansprechen (75, 76). Auch ein verzögerter Behandlungsbeginn durch zum Beispiel subklinische Verläufe sowie Spontanheilungen beeinträchtigte die SVR-Raten nicht negativ (77), sodass die antivirale Therapie erst nach laborchemischer Bestätigung von HCV-RNA 12 Wochen nach Diagnose initiiert wurde.

Bezüglich Behandlungsdauer und Dosierungsschema bei der chronischen Infektion mit HCV ergaben wissenschaftliche Untersuchungen eine große Variationsbreite (77, 78). So konnte zum Beispiel in der IDEAL-Studie bei einer Reduktion der herkömmlichen PEG-INF- alpha 2b -Dosis von 1,5 auf 1,0 µg in allen Genotypen keine signifikanten SVR-Raten zeigen, sodass dieses Schema zumindest im Falle hoher therapieassoziiierter Nebenwirkung in Betracht gezogen werden sollte (74).

Für die Indikationsstellung der antiviralen Therapie spielen neben der Beachtung genereller Kontraindikationen (dekompensierte Leberzirrhose, schwere Depression/Psychose, Anämie/Neutropenie/Thrombozytopenie, Hämoglobinopathien, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nierenversagen, Schwangerschaft/fehlende Kontrazeption, zerebrales Anfallsleiden, Autoimmunerkrankungen, Zustand nach Organtransplantationen) auch die individuelle Prognose eines HCV-Patienten sowie dessen Voraussetzungen für eine erfolgreiche antivirale Therapie eine nicht unerhebliche Rolle. So muss zum einen die Gefahr der Krankheitsprogression mit Spätfolgen wie Leberzirrhose oder HCC dem Risiko potentieller Nebenwirkungen der

antiviralen Langzeittherapie gegenübergestellt werden (19, 37). Zum anderen sollten die individuellen Voraussetzungen eines jeden HCV-Patienten für eine erfolgreiche und anhaltende antivirale Therapie Berücksichtigung finden. Als therapieunabhängige positive Variablen für die SVR-Rate ließen sich dabei vor allem Genotyp 2 und 3, niedrige HCV-RNA-Level, niedrigeres Körpergewicht, junges Alter sowie fehlende zirrhotische Veränderungen ermitteln (79). Außerdem zeigte sich in jenem Patientenkollektiv die prognostische Bedeutung des frühen virologischen Ansprechens für einen dauerhaften Behandlungserfolg im Sinne einer SVR (80). Als ungünstige Parameter für die Langzeitprognose konnten u.a. Alter, männliches Geschlecht, Übergewicht, fortgeschrittene Fibrose, erhöhte Transaminasen- und Eisenspiegel sowie eine hohe prätherapeutische Viruslast identifiziert werden (81).

1.3 Therapieinduzierte Nebenwirkungen

1.3.1 Nebenwirkungsprofil der antiviralen Kombinationstherapie

Die Effektivität der antiviralen Kombinationstherapie bestehend aus Interferon alpha und Ribavirin wird limitiert durch eine Vielzahl an medikamentenassoziierten Nebenwirkungen. Insbesondere Interferon zwingt die Patienten aufgrund seines sowohl somatischen als auch neuropsychiatrischen Nebenwirkungsprofils nicht selten zur Aufgabe des geplanten Therapieschemas. So muss Schätzungen zu Folge aufgrund der IFN-induzierten Depression bei circa 40% der Patienten die Dosierung frühzeitig reduziert werden. In 14% der Fälle wird deswegen sogar ein vollständiger Therapieabbruch erforderlich. Ribavirin hingegen scheint selbst keine signifikanten Effekte auf Stimmung und Psyche zu haben, jedoch vermag es die Interferon-induzierten Nebenwirkungen nochmals zu potenzieren (72, 82, 83). Das Spektrum reicht dabei von uncharakteristischen Grippesymptomen über diverse Veränderungen im Blutbild bis hin zu gravierenden neuropsychiatrischen Krankheitsbildern (siehe Tabelle Nr. 2).

UAW	Inzidenz in %	UAW	Inzidenz in %	UAW	Inzidenz in %
Müdigkeit	50-64	Kopfschmerzen	50-62	Fieber	43-56
Myalgie	42-56	Schüttelfrost	24-48	Alopezie	28-36
Arthralgie	27-35	Verwirrtheit	24-35	Depression	21-34
Anorexie	14-32	Dermatitis	16-21	Anämie	12-22
Neutropenie	17-20	Thrombopenie	3-6		

Tabelle Nr. 2: Tabellarische Darstellung der Inzidenz häufiger Nebenwirkungen einer antiviralen Kombinationstherapie bei Patientin mit chronischer Hepatitis-C-Infektion

Bei ungefähr 30% der Patienten können verschiedene therapieinduzierte psychiatrische Störungen diagnostiziert werden. Hierbei sind vor allem Persönlichkeitsstörungen, Stimmungsschwankungen, Angstzustände, suizidale Tendenzen sowie manische und psychotische Symptome zu nennen (84). Differentialdiagnostisch müssen diese therapieassoziierten Nebenwirkungen von den neuropsychiatrischen Störungen abgegrenzt werden, wie sie im Krankheitsverlauf der chronischen HCV-Infektion häufig auftreten. So leiden 68% der Patienten auch ohne medikamentöse Behandlung unter allgemeiner Abgeschlagenheit, verminderter Leistungsfähigkeit, Kopfschmerzen, Müdigkeit, subklinischen kognitiven Störungen sowie psychomotorischer Verlangsamung. Auch depressive Symptome können unabhängig von der Therapie bei 2-30% der HCV-Infizierten festgestellt werden (85-90). In der Regel treten die therapieinduzierten Probleme erst ungefähr drei Wochen nach Beginn der Kombinationstherapie auf, wobei auch frühere unspezifische neuropsychiatrische Auffälligkeiten beobachtet werden können. Diese sind aufgrund ihrer klinischen

Vielfalt oft schwer zu identifizieren: Asthenie, Irritabilität, psychomotorische Verlangsamung, depressive Stimmungslage, Anorexie, Libidoverlust, Konzentrations- und Aufmerksamkeitsprobleme, Schwächeanfälle und Kopfschmerzen. Die mit Abstand häufigste neuropsychiatrische Nebenwirkung stellt jedoch die Depression dar. Sie kann die Compliance der Patienten nachhaltig verringern und ist somit prognostisch von enormer Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass signifikant ansteigende Depressionswerte im Therapieverlauf mit einem verminderten Therapieansprechen korrelieren (91). Die klinischen Manifestationsformen der IFN-induzierten Depression sind denen der nicht medikamentös induzierten Depression insgesamt sehr ähnlich: allgemeine depressive Stimmungslage, Apathie, Angstzustände, Anhedonie und neurovegetative Symptome (Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Konzentrations- und Schlafstörungen) (92, 93). Die größte vitale Gefährdung liegt im suizidalen Verhalten, vor allem weil bei der Mehrzahl der betroffenen Patienten zunächst keinerlei Risikofaktoren zu identifizieren sind. Neben Komplikationen eines ernsten depressiven Syndroms und Störungen der Impulskontrolle scheinen auch Komorbiditäten wie chronischer Alkoholabusus oder die Koinfektion mit HIV Einfluss zu haben. Die Prävention stellt sich aufgrund der meist fehlenden prädiktiven Faktoren als äußerst schwierig dar. Zusammenfassend treten suizidale Neigungen, Selbstmordversuche sowie durchgeführte Selbstmorde jedoch nur bei einer kleinen Minderheit der behandelten Patienten auf (84).

Die negativen prognostischen Auswirkungen der medikamenteninduzierten Depression auf das Ansprechen der Kombinationstherapie und somit dem gesamten Krankheitsverlauf zeigt die enorme Bedeutung einer engmaschigen therapiebegleitenden Betreuung mit regelmäßiger psychometrischer Evaluation. Eine Reihe von Tests steht zum neuropsychiatrischen Screening zur Verfügung: Selbstbeurteilungstests, wie zum Beispiel die Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), die Self-Rating Depression Scale (SDS) oder der Beck Depression Inventory (BDI) (94). Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, Risikopatienten frühzeitig zu identifizieren und gegebenenfalls eine antidepressive Behandlung einzuleiten.

Obwohl hinsichtlich der molekularen Grundlagen der toxischen Wirkung von Interferon nach wie vor noch Unklarheit besteht, so scheinen vor allem die beobachteten niedrigen 5-HT-Serotoninwerte für die Ursache der depressiven Symptomatik eine zentrale Rolle

zu spielen (13). Angesichts dessen wäre es verständlich, warum sich insbesondere selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) als Therapiemöglichkeit bewährt haben. Die Verabreichung von Paroxetin ermöglichte demnach bei 78,6% der Patienten die konsequente Durchführung der Kombinationstherapie über die vorgesehene Gesamtdauer. Demnach konnte schon 2 Wochen nach Beginn der SSRI-Gabe ein signifikanter Rückgang der Depressionswerte beobachtet werden (95). Vergleichbare Therapieerfolge sind inzwischen auch für Citalopram (96, 97) und Sertralin (98) nachgewiesen.

1.3.2 Ursachen der psychiatrischen Nebenwirkungen von Interferon alpha

Die exakten Hintergründe der psychomotorischen Nebenwirkungen unter IFN alpha sind noch immer nicht vollständig geklärt. Bisherige Studien stützen jedoch die Vermutung, dass der verantwortliche Mechanismus weder krankheits- oder dosisabhängig ist, noch psychodynamische Ursachen hat (99). Wahrscheinlicher scheint, dass es sich hierbei um Begleiteffekte der zahlreichen molekularbiologischen Mechanismen der Interferonwirkung handelt.

Die vermutlich wichtigste Rolle in diesem Zusammenhang spielt die durch Interferongabe induzierte Abnahme des Serum-Tryptophanspiegels (99, 100). Ursache hierfür ist die Aktivierung des Immunsystems mit gesteigerter Metabolisierung der 5-HT Vorstufe Tryptophan zum N-Formylkynurenin (als Konsequenz einer verstärkten Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)) (101, 102). Die daraus resultierende Abnahme des Serotoninspiegels gilt heute als gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression.

Ebenfalls große Bedeutung scheint der Einfluss von IFN alpha auf den peripheren sowie zentralen Zytokinhaushalt zu haben. Über komplexe Signalkaskaden wird das Immunsystem aktiviert und gleichzeitig die Produktion inflammatorischer Zytokine (insbesondere IL-6) angeregt. Dies korreliert nicht nur mit einem gehäuften Auftreten depressiver Symptome sondern auch mit Konzentrations- und Gedächtnisschwierigkeiten, hirnorganischen Störungen sowie den typischen grippeartigen Beschwerden (103-114).

Durch die Wirkung von IFN alpha als Agonist an diversen Opiatrezeptoren ergeben sich weitere Konsequenzen. So können Veränderungen im glutamergen oder dopaminergen

System entzugsähnliche Symptome auslösen sowie verschiedene psychotische Störungen verursachen (115, 116).

Darüber hinaus beeinflusst IFN alpha die Funktion der Schilddrüse. Auftretende depressive Symptome sowie ein körperliches Schwächegefühl mit Müdigkeit können auch aus einer hypo- beziehungsweise hyperthyreotischen Stoffwechsellage resultieren und müssen deshalb differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden (117, 118, 119).

1.3.3 Bedeutung der genetischen Variation in IL28B für die Ansprechraten einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis-C-Infektion

Weltweite Unterschiede bezüglich der Ansprechraten einer Interferontherapie bei Mitgliedern unterschiedlicher ethnischer Herkunft ließen einen Zusammenhang zwischen Genom und Therapieerfolg vermuten. So konnten bei europäisch stämmigen Patienten trotz identischer Therapieregime signifikant höhere SVR-Raten als bei HCV-Infizierten afrikanischer Herkunft aufgezeigt werden.

2009 wies Dongliang Ge et al. erstmals nach, dass ein spezifischer genetischer Polymorphismus mit der SVR-Rate in sämtlichen Patientengruppen assoziiert ist (120). Hierbei handelt es sich in erster Linie um den Single Nucleotide Polymorphismus rs 12979860, welcher sich drei Kilobasen strangaufwärts des IL28B-Gens auf Chromosom 19 befindet. Doch auch zwei weitere SNPs in direkt benachbarter DNA-Lokalisation weisen genomweite signifikante p Values auf: eine G zu C Transition 37 Basenpaare strangaufwärts des Translations-Initiatorcodons (rs 28416813) sowie ein nicht-synonym codierender SNP (rs 8103142) mit einer Aminosäuresubstitution von Lysin zu Arginin an Position 70.

Aufgrund des unterschiedlichen Therapieansprechens sowie der charakteristischen weltweiten Verteilung der einzelnen Genotypen können auch die Differenzen bezüglich Therapieerfolg zwischen Patienten afrikanischer beziehungsweise europäischer Herkunft wissenschaftlich basiert begründet werden.

Während sich die meisten Studien bei diesem Sachverhalt auf Patientenkollektive mit HCV Genotyp 1 konzentrierten, konnten Mangia et al. 2010 den Zusammenhang auch für Genotyp 2 und 3 nachweisen, für welche bis dato keine zuverlässigen Forschungsergebnisse vorlagen (121).

1.4 Bedeutung der genetischen Variation in IL28B für die Ansprechraten einer antiviralen Therapie bei chronischer Hepatitis-C-Infektion

1.4.1 Allgemeine Erläuterung des Begriffes Single Nucleotide Polymorphismus (SNP)

Allgemein handelt es sich bei einem SNP um spezifische repetitive Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang. Als stabile genetische Marker zwischen einzelnen Individuen einer Population spielen SNPs eine wichtige Rolle für genetische Studien. Die Auswirkungen einer solchen Punktmutation hängen vom jeweiligen Basenaustausch ab, durch den sich die vermittelten Informationen des Codons verändern oder auch identisch bleiben können. Man unterscheidet hierbei zwischen einem synonymen SNP, bei der das Basentriplett für die identische Aminosäure codiert, und einem nicht-synonymen SNP, bei dem ein Wechsel der Aminosäure stattfindet. Falls ein solcher nicht-synonymer SNP in einer codierenden Region liegt (coding SNP), kann es zu Auswirkungen auf die entsprechende Proteinfunktion kommen und diverse strukturelle sowie funktionelle Defekte nach sich ziehen. Bei anderen Subtypen der SNPs entstehen durch die Lokalisation in regulatorischen Genomregionen Störungen in der Genregulation (regulatory SNP), wodurch Transkription und Proteinkonzentration beeinflusst werden können. Auch die RNA-Prozessierung kann durch spezifische SNPs, zum Beispiel durch eine Basenänderung an einer Spleißstelle, irritiert werden. In diesem Fall spricht man dann von einer structural RNA-SNP (122).

1.4.2 Details zum SNP im Bereich des IL28B Gens

Der rs 12979860 SNP liegt nur drei Kilobasen strangaufwärts vom IL 28B-Gen entfernt, welches für das Interferon vom Typ III codiert. Typ III Interferon besteht aus drei Subtypen, deren Gene jeweils auf dem humanen Chromosom 19q13 lokalisiert sind. Strukturell lassen sie sich dem IL 10 aus der Familie der Zytokine zuordnen, während sie funktionell eher den Typ I Interferonen ähneln, die im Zuge viraler Infektionen über die JAK-STAT-Signalwege vom Körper ausgeschüttet werden und in vitro eine antivirale Wirkung aufzeigen (123, 15). IFN 1 wurde bereits eine dosis- und zeitabhängige HCV-Inhibition, eine Induktion der Interferon stimulierten Gene sowie eine Verstärkung der antiviralen Effektivität von IFN alpha nachgewiesen (16). Eine vergleichbare Funktionsweise des IFN 3 ist denkbar. In vitro stellt sich IFN 3 bezüglich seiner protektiven Wirkung auf Hep G2 Zellen sogar noch potenter als IFN 1 dar, wenn

diese durch Zelllyse bei Infektion mit dem Encephalomyelitisvirus gefährdet sind (32). Außerdem wurden bei IFN Typ III weniger interferon-typische Nebenwirkungen beobachtet, da die spezifischen Rezeptoren der drei IFN III-Subtypen nur an einer limitierten Zahl an Zelltypen vorliegen (18).

1.4.3 Konsequenzen der unterschiedlichen Genotypenverteilung von IL28B für die basale Virusreplikation, die natürliche körpereigene Viruselimination sowie die Sustained Virological Response (SVR)

Der Zusammenhang zwischen der Variante des genetischen Polymorphismus im Bereich des Gens IL28B und dem dauerhaften Ansprechen einer antiviralen Kombinationstherapie basiert zu einem großen Teil auf der unterschiedlichen Genotypenverteilung.

Dongliang Ge et al. untersuchte in einer Studie mehr als 1600 Patienten unterschiedlicher Herkunft und konnte hierbei erstmals eine starke Assoziation zwischen dem SNP rs 12979860 und der SVR in allen Patientengruppen aufzeigen (120). Inzwischen konnte dieser Zusammenhang durch eine Reihe an Studien bestätigt werden (124, 125, 126, 127). Bei Patienten europäischer Herkunft weist der CC Genotyp eine zweifach höhere SVR-Rate auf als der TT Genotyp. Entsprechende Verhältnisse konnten auch für Patienten der amerikanischen beziehungsweise hispanischen Bevölkerung nachgewiesen werden. Doch der Genpolymorphismus erklärt nicht nur die Differenzen innerhalb einer Bevölkerungsgruppe. Stattdessen scheint er auch für das unterschiedliche Therapieansprechen zwischen den Patienten verschiedener Herkunftsländer verantwortlich zu sein. Demnach wird geschätzt, dass sich die Differenzen der SVR-Raten nahezu zur Hälfte auf die weltweit unterschiedliche Verteilung der Genfrequenzen des C-Allels stützen. Das bessere Therapieansprechen bei Europäern basiert demnach auf der insgesamt höheren Rate am CC-Genotyp. Des Weiteren konnte dokumentiert werden, dass afrikanische Patienten vom CC-Genotyp eine signifikant höhere SVR-Rate (55,3%) aufzeigen als europäische Patienten vom TT-Genotyp (33,3%). Diese Resultate verdeutlichen, dass der individuell vorliegende Genotyp des Patienten für die Prognose bezüglich eines dauerhaften Therapieansprechens von wesentlich größerer Bedeutung ist als seine ethnische Herkunft (120).

Außerdem suchte Dongliang Ge et al. nach einem Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Genomvarianten und der basalen Viruslast noch vor Einleitung der antiviralen Kombinationstherapie. Erstaunlicherweise war das Vorliegen des C-Allels, das prognostisch positiv für das Therapieansprechen zu werten ist, gleichzeitig mit einer deutlich erhöhten basalen prätherapeutischen Viruslast gekoppelt. Diese Assoziationen lassen vermuten, dass der IL28B Polymorphismus eine wichtige Rolle in der Regulation der Interferon stimulierten Genexpression einnimmt, was sowohl für die basale Viruslast als auch für die SVR von grundlegender Bedeutung ist. Eine Korrelation zwischen initialer Viruslast und späterem Therapieansprechen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Des Weiteren gab die Studie Hinweise darauf, dass die genomische C-Allel Frequenz des IL28B Gens positive Auswirkungen auf die natürliche Virusbeseitigung haben könnte. So lagen bei chronisch infizierten Patienten verglichen mit der gesunden Allgemeinbevölkerung signifikant reduzierte C-Allel-Raten vor (120). Dieser Zusammenhang muss jedoch noch durch genauere wissenschaftliche Vergleichsstudien endgültig bestätigt werden.

1.5 Zielsetzungen der Studie

Hauptziel unserer Arbeit war es, die Bedeutung von drei SNPs im Bereich des IL28B-Gens für die Verträglichkeit einer interferonbasierten, antiviralen Kombinationstherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion zu untersuchen.

Hierbei stand der Zusammenhang zwischen Genom und Ausmaß der therapieassoziierten, neuropsychiatrischen Nebenwirkungen im Mittelpunkt. Hierzu wurde bei unserem (für die mitteleuropäische Genotypenverteilung von IL28B repräsentativem) Patientenkollektiv eine DNA-Sequenzierung sowie standardisierte, neuropsychiatrische Testverfahren durchgeführt. Anschließend sollte der Vergleich der einzelnen Genotypen mit den jeweils erzielten Testergebnissen zeigen, ob eine Art genetisches Risiko für das verstärkte Auftreten neuropsychiatrischer Nebenwirkungen existiert.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit stellte die Prüfung des in anderen wissenschaftlichen Studien postulierten Zusammenhangs zwischen dem C-Allel im Bereich des Genpolymorphismus IL28B und einer erhöhten SVR-Rate dar. Hierfür wurden die

Sequenzierungsmuster mit den HCV-RNA-Konzentrationen nach einer 24 wöchigen therapiefreien Periode verglichen.

Insgesamt sollte die Studie prüfen, ob durch eine initiale Genotypisierung von Hepatitis-C-Patienten Rückschlüsse auf den anhaltenden Therapieerfolg und die zu erwartenden neuropsychiatrischen Nebenwirkungen einer Interferontherapie gezogen werden können.

Ziel war es einen genetischen Marker zu finden, mit dem wir Risikopatienten frühzeitig erkennen können und sie anschließend durch Anpassung von Therapieschema, -intensität und -dauer erfolgreicher behandeln zu können. Je nach genetischem Risikoprofil könnten dann auch prophylaktische, unterstützende Maßnahmen wie Psychotherapie oder eine antidepressive Medikation in Erwägung gezogen werden.

2. Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Im Mittelpunkt unserer Studie stand die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen drei verschiedenen SNPs im Bereich des Gens IL28B auf Chromosom 19 und den neuropsychiatrischen Nebenwirkungen einer interferonbasierten antiviralen Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion.

Das verwendete Studiendesign entspricht einer Querschnittsuntersuchung (Zeitpunkt nach Beendigung der antiviralen Therapie), in die zusätzlich die Daten einer vorgeschalteten prospektiven, longitudinalen Studie eingingen (Erfassung des Therapieverlaufs mit Monitoring der Therapie-Nebenwirkungen).

Wesentliche Outcome-Variablen waren hierbei die genotypische Ausprägung der Studienteilnehmer bezüglich der betrachteten SNPs und die testpsychologisch erfassten, therapieassoziierten (neuro-)psychiatrischen Nebenwirkungen. Ziel war dann die rechnerische Überprüfung eines möglichen statistischen Zusammenhangs zwischen Genotypenverteilung einerseits und den Ergebnissen der verwendeten neuropsychologischen und psychomotorischen Testverfahren andererseits mit Hilfe geeigneter interferenzstatistischer Verfahren.

Die Erfassung bzw. Messung der durch die Interferonbehandlung induzierten neuropsychiatrischen Symptome umfasst zwei größere inhaltliche Bereiche. Die Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung (TAP) wurde verwendet um neurokognitive Aspekte zu erfassen (Aufmerksamkeits-, Konzentrations- und Gedächtnisleistungen), die Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) als Fragebogenverfahren diente der Erfassung bestimmter Aspekte neuropsychiatrischer Symptomatik (Depressivität, Angst).

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit wurde aus insgesamt 93 Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg rekrutiert, welche die folgenden Kriterien erfüllten:

klinische Symptomatik bei gesicherter Hepatitis-C-Infektion, Fehlen aller Ausschlusskriterien, schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme sowie Indikation für eine antivirale Behandlung auf der Basis von Interferon alpha (siehe Tabelle Nr. 3).

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
18-65 Jahre alt	HIV- Koinfektion
geschlechtsunabhängig	mangelnde Deutschkenntnisse
internistische Kriterien für eine Interferon-alpha-Therapie gegeben	Hinweise auf eine Psychose oder schwerwiegende Depression in der Vorgeschichte
Zustimmung zur Studienteilnahme	

Tabelle Nr. 3: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien

2.1.1 Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung (TAP)

Die TAP besteht aus einer Reihe unterschiedlicher Testverfahren. Diese ermöglichen es, vorliegende Aufmerksamkeitsstörungen möglichst differenziert zu diagnostizieren. Hierzu bedient man sich Verfahren geringer Komplexität um umschriebene Teilfunktionen zu untersuchen. Die Beeinträchtigung der Resultate durch eventuelle Defizite wie sensorische beziehungsweise motorische Ausfälle, Gedächtnis- oder Sprachstörungen werden dabei so gut wie möglich ausgeschlossen. Die Auswahl simpler Reaktionsparadigmen, in denen selektiv auf deutlich abgrenzbare und sprachfreie Reize durch einfachen Tastendruck zu reagieren ist, basiert auf Gronwalls Auffassung von 1987: „Because results from complex tasks have done little to add to our understanding of the effect of head injury on attention, it seems time to change direction, to examine simpler processes and simpler responses.“ Die Kriterien zur Einstufung der Leistungsfähigkeit stellen hierbei zum einen die Reaktionszeiten (Angabe in Sekunden), zum anderen eventuell begangene Fehlreaktionen oder Auslassungen dar.

Die ursprüngliche Testbatterie für Aufmerksamkeitsprüfung (TAP) setzt sich aus insgesamt 12 Subskalen zusammen: Alertness, Arbeitsgedächtnis (in drei Schwierigkeitsgraden), Augenbewegung, Gesichtsfeld- bzw. Neglectprüfung, geteilte Aufmerksamkeit, Go/No-Go Test (in zwei Varianten), Inkompatibilität, Intermodaler Vergleich, Reaktionswechsel (in zwei Varianten), Verdeckte visuelle Aufmerksamkeitsverschiebung, Vigilanztest (in vier Varianten) sowie Visuelles

Scanning. Beim ausgewählten Patientenkollektiv wurden für vorherige Studien jedoch nur 5 der insgesamt zwölf Einzeltests ausgewählt: Alertness, Vigilanz, Arbeitsgedächtnis, geteilte Aufmerksamkeit, Reaktionswechsel.

Die Gründe für die Reduktion der angewendeten Untersuchungen sind vielfältig: Zum einen wäre die Durchführung sämtlicher TAP-Verfahren mit einer Gesamtbearbeitungszeit von ungefähr zwei Stunden enorm zeitintensiv und somit sowohl für Patient als auch Untersucher nicht praktikabel. Zum anderen soll gezielt auf die Teilaspekte der Konstrukte „Aufmerksamkeit“ und „Konzentrationsfähigkeit“ eingegangen werden, welche am ehesten den spontan im Interview geschilderten unerwünschten Begleiteffekten unter Interferon alpha-Behandlung entsprechen. Hierzu sind vor allem die drei Verfahren Alertness, Vigilanz und Arbeitsgedächtnis geeignet. Außerdem wurde bei der Auswahl der Subtests auf deren Relevanz im Alltag des Patienten geachtet. So spielt die geteilte Aufmerksamkeit zum Beispiel im Straßenverkehr eine zentrale Rolle. Letztlich wurde noch die Untersuchung des Reaktionswechsels als nützliches Screening-Instrument ausgewählt.

Für unsere Studie zur Überprüfung des Vorliegens einer Korrelation zwischen Genotypenverteilung und Ausmaß der therapieassoziierten Nebenwirkungen beschränkten wir uns auf die Auswertungen von zwei der fünf zuvor durchgeführten Subtests, nämlich Alertness sowie Vigilanz. Grund hierfür waren die Ergebnisse diverser klinischer Voruntersuchungen. In diesen wurde deutlich, dass vor allem bei diesen beiden Testverfahren signifikante klinische Veränderungen unter Interferontherapie festzustellen waren.

(128, 129)

2.1.1.1 Subtest Alertness

Bei dieser Untersuchung wird die Fähigkeit ermittelt, in Erwartung eines Reizes hoher Priorität das Aufmerksamkeitsniveau zu steigern beziehungsweise aufrechtzuerhalten, wie es zum Beispiel einem Sprinter beim Warten auf den Startschuss ergeht. Im Test wird die Alertness durch die Beschleunigung der einfachen Reaktionszeit auf einen durch einen akustischen Warnreiz angekündigten kritischen visuellen Reiz (in Form eines schwarzen Kreuzes auf dem Bildschirm) deutlich. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf dem ABBA-Design (A= Durchführung ohne Warnreiz, B= Durchführung mit

Warnreiz), wobei das Intervall zwischen Warnton und kritischem Reiz unterschiedlich groß ist und zufällig erfolgt. Die Reizanzahl pro Serie liegt in der Standarddurchführung bei 20 Reizen. Durchgänge, bei denen bereits auf den akustischen Warnton reagiert wurde (Reaktionszeiten kleiner als 100 msec) oder ausbleibende Reaktionen (Reaktionszeiten größer als 2 sec) werden wiederholt.

(128, 129)

2.1.1.2 Subtest Vigilanz/Daueraufmerksamkeit

Bei diesem Testverfahren wird die Fähigkeit zur längerfristigen Aufrechterhaltung der Aufmerksamkeit geprüft. Im Alltag fallen Vigilanzstörungen durch rasche Ermüdbarkeit/ häufige Erschöpfungszustände auf. Nicht selten muss der Versuchsaufbau deshalb frühzeitig abgebrochen werden.

Geprüft werden kann die Daueraufmerksamkeit mit Hilfe von vier Versuchsvarianten: einem akustischen, zwei optischen sowie einem optisch/akustischen Vigilanztest. Die Ergebnisse der verschiedenen Modalitäten können sich dabei durchaus unterscheiden. Mögliche Ursachen hierfür sind unter anderem lokal begrenzte Schäden der tertiären Felder der sensorischen Kortex oder auch selektive Störungen der supramodalen Kontrollmechanismen. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns dabei allein auf den optisch/akustischen Vigilanztest. Hierbei werden Töne und Buchstaben dargeboten, wobei eine Abfolge von einem hohen Ton und einem folgenden E oder einem tiefen Ton und einem folgenden N entdeckt werden soll.

Im Vergleich zu den klassischen Verfahren der isoliert akustischen bzw. optischen Tests, die mit noch geringerer Komplexität und sehr monotonen Untersuchungsbedingungen durchgeführt wurden, ermöglicht der kombinierte Test durch den erhöhten Schwierigkeitsgrad eine deutlichere Unterscheidung zwischen den Probanden.

(128, 129)

2.1.2 Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)

Dieses Testverfahren dient der Ermittlung von Depressionen und Ängsten sowohl bei Patienten mit körperlichen Erkrankungen als auch bei Patienten mit möglicherweise psychogenen Körperbeschwerden. In erster Linie handelt es sich dabei um ein

Screeningverfahren. Inzwischen findet die HADS aber auch in der Verlaufsbeurteilung zur dimensionalen Schweregradbestimmung regelmäßige Anwendung. Demnach wird mittels eines Selbstbeurteilungsbogens die Ausprägung beziehungsweise das Ausmaß ängstlicher und depressiver Symptomatik während der vergangenen Woche erfasst.

Dieser aus 14 Items bestehende Fragebogen über das emotionale Befinden des Patienten lässt sich nochmals in die Bereiche Depression sowie Angst unterteilen. Beide Subskalen setzen sich aus jeweils sieben Items zusammen, wobei bei jeder Frage eine vierstufige (0-3) Antwortmöglichkeit zur Verfügung steht. Durch Addition der einzelnen Antworten resultiert ein möglicher Wertebereich von minimal 0 bis maximal 21 Punkten. Hierbei steigt der Grad der emotionalen Beeinträchtigung mit zunehmender Gesamtpunktzahl. Körperliche Symptome werden bei diesem Testverfahren und der oben beschriebenen Punktevergabe generell nicht berücksichtigt, um eine Beeinflussung der Testergebnisse durch somatische Komorbiditäten zu vermeiden. Stattdessen liegt der alleinige Fokus auf dem psychischen Befinden des Patienten. Hierdurch können auch leichtere Ausprägungen von psychischen Störungen registriert werden. Schwere psychopathologische Veränderungen werden hingegen nicht berücksichtigt, was wiederum nicht unerheblich zur Akzeptanz dieses Testverfahrens in der Zielgruppe beiträgt. Als cut-off Wert für klinisch relevante Depressionen wurde eine Gesamtpunktzahl >9 festgelegt. Bei der Subskala Angst liegt der cut-off Wert hochaffektiver Patienten bei >8 Punkten.

Durch Erfahrungsberichte anderer Studien und mehrere Voruntersuchungen wurde in unserer Studie ausschließlich die Subskala Depression berücksichtigt, da diese deutlichere Veränderungen während der Interferontherapie aufzeigte.

(130, 131)

2.2 Materialien und molekularbiologische Methoden

2.2.1 Materialien

2.2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Fedegari, Pavia, Italien
Elektrophoresegerät <i>power pac 200</i>	BioRad Laboratories, München
Kodak M35 X-omat Processor	Eastman Kodak Company, Rochester N.Y., USA
Gefrierschrank -70°C <i>Hera freeze</i>	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt
Kühlschrank 7°C <i>glassline</i>	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge <i>Laborfuge 400R</i>	Heraeus, Hanau
Photometer <i>Ultrospec 2100 pro</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Quarzküvette 100µl	Hellma, Müllheim
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Waage	Sartorius laboratory, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Häningsen
Biometra BioDoc TI 3 Biometra BioDoc Controller Biometra video graphic printer (Sony) Biometra Video Monitor WV-BM 900 (Panasonic)	Biomedizinische Analytik GmbH, 37079 Göttingen, Deutschland
Eismaschine „AF-10“	Scotsman Ice Systems Vernon Hills, IL, USA

Elektrophorese- Kammersysteme	MWG BIOTECH, Deutschland
Heizblock	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co KG, 31311 Uetze/ Hänigsen, Deutschland
Mikrowelle	AFK, Düsseldorf
Power Pac 300	BIO RAD, USA
UV-Photometer „Ultrospec 2100 pro“	Amersham Bioscience, Freiburg
DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc., Japan

Tabelle Nr. 4: Tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen <i>epT.I.P.S.</i> (0,1-20; 2-200; 50-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Kimtech Science, Koblenz-Rheinhafen
Reaktionsgefäße 50ml 15ml 2ml 1,5ml 0,2ml Micro AmpReaction Tube	Falcon, Heidelberg Falcon, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Life Technologies, Darmstadt

Tabelle Nr. 5: Tabellarische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma
Agarose Biozym LE	Biozym Scientific GmbH, 31833

	Oldendorf, Deutschland
Aqua dest. <i>Ampuwa</i>	Fresenius Kabi, Bad Homburg
EDTA 0,5 M pH 8,0	Life Technologies GibcaBRL ultra pur, Paisley, Scotland, U.K.
Ethanol abs.	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
GelRed Nucleic, 10,000x in water	Biotium, Inc. 3159 Corporate Place Hayward, CA 94545
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas, #SM1168
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES Buffer Solution (1M)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lauryl Sulfate (SDS, Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle Nr. 6: Tabellarische Auflistung der verwendeten Chemikalien

2.2.1.4 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Fail Safe PCR PreMix Selection Kit:	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI 53713
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle Nr. 7: Tabellarische Auflistung der verwendeten Kits

2.2.1.5 Primer

Primer	Hersteller
Primer ff IL 28 B neu 5'CCA CAT CTC TGT CCG TGC 3'	Eurofins MWG Operon Biotech, Ebersberg, Deutschland
Primer rv IL 28 neu 3'CCA CTA CAG AGC CAG GTG 5'	
Primer ff rs 12979860 neu 5'GGTGCAATGGATCATGC3'	
Primer rv rs 12979860 neu 3'GCTGAGAATGGGGTTTGC5'	

Tabelle Nr. 8: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer

2.2.1.6 Standardlösungen

Standardlösungen	Zusammensetzung
GelRed Nucleic	10,000x, in dest. H ₂ O gelöst
Probenpuffer L IV	0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose, in dest. H ₂ O gelöst
10x TBE- Puffer	109 g Trisbase 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit H ₂ O auf 100ml aufgefüllt

Tabelle Nr. 9: Tabellarische Auflistung der verwendeten Standardlösungen

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA-Isolierung aus Patientenblut

Die für die molekulargenetische Untersuchung verwendete DNA wurde zum Großteil aus bereits bei -80 °C gelagerten Blutseren isoliert. Diese wurden über mehrere Jahre von Prof. Dr. Kraus gesammelt und unter anderem 2005 für die Untersuchung der depressiven Nebenwirkungen einer antiviralen Hepatitis-C-Behandlung verwendet (132). Die für die aktuelle Studie noch fehlenden Blutserumproben wurden nach Aufklärung und Einwilligungserklärung seitens der Patienten gewonnen, als sie sich zu Kontrolluntersuchungen in der Infektionsambulanz der Universität Würzburg

vorstellten. Bis zur weiteren Verwendung wurden auch diese Proben bei $-80^{\circ}\text{Celsius}$ gelagert.

2.2.2.1.1 DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood and Tissue Kit

Die Gewinnung der DNA-Proben aus dem Nativmaterial erfolgte durch das „DNeasy Blood and Tissue Kit“ von Quiagen (Hilden, Deutschland). Dieses Kit basiert auf einer Silizium-Gel-Technologie, wobei je nach Zielsetzung sowohl genomische, mitochondriale als auch virale DNA direkt nach der Zell-Lyse selektiv an der DNeasy-Membran haften bleibt und durch anschließende Zentrifugation isoliert wird.

Die sequentiellen Arbeitsschritte orientierten sich dabei am mitgelieferten Protokoll.

2.2.2.1.2 Messung der DNA-Konzentration mittels Photometer

Die Lichtabsorption von Substanzen (im Fall der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit von Desoxyribonukleinsäuren) bei einer spezifischen Wellenlänge ist von der Konzentration der untersuchten Substanz abhängig. Nukleinsäuren zeigen ein charakteristisches Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von 260nm auf, wodurch sie sich photometrisch quantifizieren lassen.

Das Ultraviolett-Spektrophotometer bestimmt die Lichtabsorption der Proben in den drei Bereichen UV-A(260nm), UV-B(280nm) und UV-C(320nm), welche als optische Dichte (OD) ausgegeben wird. Zusätzlich berechnet es das Verhältnis von OD(260nm) zu OD(280nm), welches Auskunft über die Reinheit der Probe gibt: ein Quotient von 1,8 ist typisch für eine reine DNA-Probe, während höhere Werte ($>1,8$) auf eine RNA-Kontamination beziehungsweise niedrigere Werte ($<1,8$) auf eine Protein-Kontamination hinweisen.

Zur Durchführung der Photometrie wurden die DNA-Proben zunächst mit dH_2O in einem Verhältnis von 1: 50 verdünnt, indem wir $2\mu\text{l}$ einer DNA-Probe mit $98\mu\text{l}$ Wasser vermengten und daraufhin vortexten. Das Gemisch wurde nun in eine $100\mu\text{l}$ Küvette gegeben und mit dem Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.2 PCR-Durchführung mittels Fail Safe PCR PreMix Selection Kit

Allgemeine Erklärung der Methode:

Das Fail Safe PCR PreMix Selection Kit beinhaltet ein spezifisches und in dieser Form einzigartiges Gemisch aus thermostabilen DNA-Polymerasen sowie ein Set bestehend aus zwölf unterschiedlichen, komplett vorgefertigten Reaktions-PreMixes. Dieses umfangreiche Set diverser Reagenzien wurde speziell dazu entworfen, PCR-Reaktionen mit verschiedensten Anforderungen beziehungsweise Zielsetzungen mit zuverlässigen Resultaten und in qualitativ hochwertiger Form zu ermöglichen. Unabhängig davon wie sich die Template-DNA gestaltet, ob Routinearbeiten, DNA-Vorlagen mit einer Länge von bis zu 20kb, Matrizen mit einem hohen Anteil von GC-Basen oder komplizierten Sekundärstrukturen, mit Hilfe des Fail Safe PCR PreMix Selection Kit können sie einfach amplifiziert werden.

Im ersten Schritt muss dem Fail Safe Master Mix (bestehenden aus Enzymgemisch und Primern) die gewünschte Template DNA hinzugefügt werden. Das Ergebnis wird dann den 12 unterschiedlichen Fail Safe PCR PreMixes (A-L) beigemischt. Im Anschluss wird die PCR gestartet. Die darauffolgende Analyse der PCR-Resultate zeigt, welcher der PreMixes am besten für die Amplifizierung der Template DNA geeignet ist. Hierdurch werden verlässliche und beständige PCR-Resultate für die Amplifizierung der gewünschten Template DNA aller Studienteilnehmer (stets unter Verwendung des zuvor ermittelten optimalen Fail Safe Mixes) ermöglicht.

Durchführung:

Zunächst wurden die im Anschluss aufgelisteten Reagenzien aufgetaut und gemischt. Der so entstandene Fail Safe Master Mix wurde daraufhin auf Eis gelagert (siehe Tabelle Nr. 10).

PCR –Reaktionsansatz		
Steriles Wasser	21,5	µl
Primer 1	1,0	µl Endkonzentration 50 µM
Primer 2	1,0	µl Endkonzentration 50 µM
DNA Template	1,0	µl (1-500ng, 10*4-10*6 Moleküle)
Taq	0,5	µl
Gesamtvolumen	25	µl

Tabelle Nr. 10: PCR-Reaktionsansatz, Teil 1

Anschließend wurde abhängig von der Amplifikation jeweils 25µl eines Fail Safe PCR 2X PreMix hergestellt, auf je ein Tube pipettiert und auf Eis gelagert (siehe Tabelle Nr. 11).

PCR –Reaktionsansatz		
Amplifikation	≤ 10 kb	0,5 µl Fail Safe PCR Enzyme Mix (1,25 Einheiten)
	> 10 kb	1,0 µl Fail Safe PCR Enzyme Mix (2,5 Einheiten)
Gesamtvolumen	25	µl

Tabelle Nr. 11: PCR-Reaktionsansatz, Teil 2

Zu diesen Tubes wurden 25 µl des zuvor produzierten FailSafe Master Mix hinzugegeben und gründlich gemischt. Das resultierende Gemisch konnte anschließend nach Programmierung des Thermocyclers (siehe Tabelle Nr. 12) amplifiziert und zuletzt gefroren gelagert werden.

Thermocycler-Protokoll:

Standard PCR Bedingungen		
Denaturierung	1-2 min	92-98°C
20-40x		
Denaturierung	0,5-1 min	92-95°C
Annealing	0,5-1 min	2-5°C unterhalb der Primertemperatur
Elongation	1 min	68-72°C
Elongation	10 min	72°C
	∞	4°C über Nacht bzw. direkt -20°C

Tabelle Nr. 12: Standard PCR Bedingungen

Dabei konnten bezüglich IL28Bneu mit Puffer G und bezüglich rs 12979860neu mit Puffer J in folgenden Thermocycler-Protokollen (siehe Tabellen Nr. 13 und Nr. 14) die besten und vor allem stabilsten PCR-Ergebnisse erzielt werden.

Thermocycler-Protokoll für IL28Bneu:

Standard PCR Bedingungen		
Denaturierung	3 min	94°C
30x		
Denaturierung	40 sec	96°C
Annealing	40 sec	55°C
Elongation	40 sec	72°C
Elongation	10 min	72°C
	∞	4°C

Tabelle Nr. 13: Standard PCR Bedingungen für IL28Bneu

Thermocycler-Protokoll für rs 12979860neu:

Standard PCR Bedingungen		
Denaturierung	3 min	94°C
30x		
Denaturierung	1 min	96°C
Annealing	1 min	55°C
Elongation	30 sec	72°C
Elongation	10 min	72°C
	∞	4°C

Tabelle Nr. 14: Standard PCR Bedingungen für rs 12979860neu

2.2.2.3 Aufarbeitung des PCR-Produktes mittels PCR-Purification-Kit

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kbp wurde das QIAquick PCR Purifikation Kit von Qiagen verwendet.

Der PCR-Ansatz wurde mit dem im kommerziellen Kit mitgelieferten PB-Puffer versetzt und auf ein QIAquick-spin-Säulchen gegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und im Folgenden die Säule mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen PE-Puffer gewaschen. Durch einen erneuten Teilschritt der Zentrifugation wurde das Säulchen nun getrocknet. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgte dann durch Zugabe von destilliertem Wasser.

Die einzelnen Arbeitsschritte orientierten sich streng am standardisierten Protokoll.

2.2.2.4 PCR-Kontrolle mittels Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnten die PCR-Produkte aufgetrennt und anschließend im UV-Licht als Bande sichtbar gemacht werden. Bildhaft kann man sich ein Agarosegel als eine Art Netz vorstellen, das sich aus einer Vielzahl langer Agarosepolymer-Fäden zusammensetzt. Je höher man die Konzentration der Agarose wählt, desto kleiner sind die einzelnen Poren im Netz. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix zum Plus-Pol gezogen. Wie bei einem Sieb werden die kleineren Moleküle

schneller durch die Öffnungen bewegt als dies bei den größeren Molekülen der Fall ist. Vor der eigentlichen Gelelektrophorese musste jedoch zunächst das Agarosegel angefertigt werden. Dazu mussten zuerst 3 Gramm Agarose abgewogen und mit 200ml 1X TBE-Puffer gemischt sowie in der Mikrowelle aufgekocht werden, bis das Pulver vollständig gelöst war. Im Anschluss wurden je 40ml 1,5% Agarose mit 1 µl Ethidiumbromid in 50ml Flakon Röhrchen gemischt und in die Kammersysteme gegossen. Nach Festigung des Gels wurden die Kammern mit 1X TBE-Puffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit 10 µl DNA befüllt. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese für ca. 30 Minuten bei 130 Volt. Das Gel konnte nun vorsichtig unter das Analysegerät gelegt werden. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, die Qualität der Banden auf dem fertigen Gel unter UV-Licht-Bestrahlung zu beurteilen.

2.2.2.5 Vorbereitung der PCR-DNA-Produkte für die Sequenzierung bei LGC

Die PCR-Produkte wurden nach der Aufreinigung über das PCR-Purification-Kit auf eine Konzentration von 50-100 ng/ µl eingestellt. Abhängig von der Basenpaarlänge der PCR-Fragmente wurden folgende DNA-Konzentrationen seitens des Sequenzierungslabors vorgeschlagen:

<300 bp:	2 ng/ µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl
300-1000 bp:	5 ng/ µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl
>1000bp:	10 ng/ µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl

Zusätzlich wurden auch die Primer separat in einer Konzentration von 2pmol/ µl mit einem Mindestvolumen von 15 µl (entsprach somit einer Menge von 30 pmol Primersubstanz) in den zugehörigen 1,5ml Tubes an LGC versendet.

2.2.2.6 Sequenzierung

Unter Verwendung der unter 2.2.1.5 aufgeführten Primer erfolgt die Sequenzierung der PCR-Produkte der insgesamt 93 Studienteilnehmer. Die Sequenzierung wurde in der klassischen PCR-Technik nach Sanger durch LGC (Queens Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK (www.lgcgroup.com)) durchgeführt.

2.2.3 Statistische Methoden: Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Um den Zusammenhang zwischen den untersuchten DNA-Mutationen im Bereich von IL28B und der SVR sowie den interferonassoziierten Nebenwirkungen untersuchen zu können, mussten die Sequenzierungsergebnisse von LGC mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ausgewertet werden. Dieses mathematische Modell der Populationsgenetik besagt, dass die Zusammensetzung der Genotypen in einer panmiktischen Population anhand der Allelfrequenzen berechnet werden kann. Hierbei ist stets eine ideale Population vorausgesetzt, die sich in einem stabilen, von Evolutionsfaktoren unabhängigen, allein von der Allelfrequenz abhängigen und somit vorhersehbarem Gleichgewicht befindet. Mit Hilfe von auf dieser Theorie basierenden statistischen Rechenprogrammen konnten nun bei den drei zu untersuchenden Genpolymorphismen die Allele, also die unterschiedlichen Ausprägungsformen eines Gens (in unserem Fall also die Frage normal oder mutiert) ausgewertet und anhand folgender Gleichung die relativen Häufigkeiten der homozygoten bzw. der zwei heterozygoten Allelfrequenzen berechnet werden: $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Dabei sind p die Allelfrequenz von Allel A und q die Allelfrequenz von Allel a. Demnach entspricht p^2 der Frequenz der Homozygoten mit Merkmal A, q^2 der Frequenz der Homozygoten mit Merkmal a und $2pq$ der Frequenz der Heterozygoten mit beiden Merkmalen. Anstelle der Merkmale A bzw. a wurden abhängig von den jeweils untersuchten drei Single Nucleotide Polymorphismen die in Frage kommenden Basen eingefügt und die Ergebnisse anschließend tabellarisch aufgelistet (siehe Ergebnisteil) (133).

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzierung und statistische Auswertung der Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs

Nach initialer DNA-Isolierung aus dem Blutserum der Studienteilnehmer erfolgte zunächst eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Mittels der herkömmlichen PCR-Methode nach Sanger konnten wir im Anschluss trotz zahlreicher Optimierungsversuche und erneuter Aufarbeitung der DNA-Produkte keine stabilen DNA-Konzentrationen erzielen. Neben zu niedrigen Werten in der photometrischen Kontrolle spiegelten sich die unbefriedigenden Ergebnisse in Form von unspezifischen, doppelten oder gar fehlenden Banden in der Agarosegelelektrophorese wieder (siehe Abbildung Nr.1 sowie Abbildung Nr. 2).

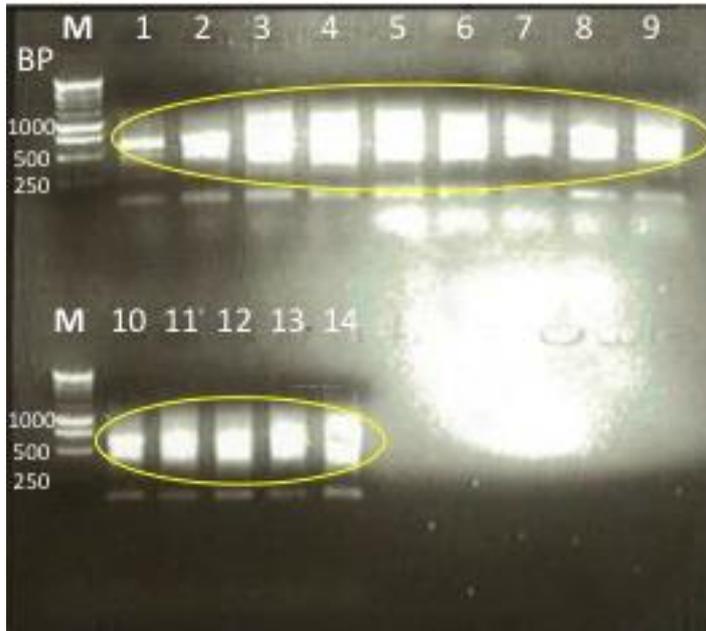


Abbildung Nr. 1:

Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte nach Amplifizierung mittels klassischer PCR nach Sanger (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%):

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-9= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 1-9: PCR-Produkte unterschiedlicher PCR-Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen von Primer, Magnesium, BSA (bovine serum albumin)

Gelb markiert: fehlerhafte, unspezifische bzw. nicht deutlich abgrenzbare Banden

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-14= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 10-14: PCR-Produkte unterschiedlicher PCR-Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen von Primer, Magnesium, BSA (bovine serum albumin)

Gelb markiert: fehlerhafte, unspezifische bzw. nicht deutlich abgrenzbare Banden



Abbildung Nr. 2:

Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte nach Amplifizierung mittels klassischer PCR nach Sanger (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%):

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-8= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 1-8: PCR-Produkte unterschiedlicher PCR-Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen von Primer, Magnesium, BSA (bovine serum albumin)

Gelb markiert: fehlende Banden

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-14= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 9-14: PCR-Produkte unterschiedlicher PCR-Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen von Primer, Magnesium, BSA (bovine serum albumin)

Gelb markiert: fehlerhafte, doppelte bzw. fehlende Banden

Eine Sequenzierung dieser PCR-Produkte war folglich nicht möglich. Neben den allgemeinen Schwierigkeiten jener klassischen PCR-Methode (siehe Diskussion) waren auch ein hoher GC-Gehalt oder komplexe Sekundärstrukturen der Zielsequenzen als Ursachen denkbar.

Da zwischen Guanosin und Cytosin verglichen mit Adenosin und Thymin drei anstelle von zwei Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen, zeichnet sich DNA mit hohem GC-Anteil durch eine deutlich erhöhte Stabilität der Doppelhelixstruktur aus. Um diese aufzulösen sind daher auch höhere Schmelztemperaturen im Rahmen einer PCR notwendig was wiederum die erfolgreiche Anlagerung des Primers einschränkt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinanderfolgenden GC-Basenpaarungen energetisch günstiger sind, wodurch diese DNA-Abschnitte thermodynamisch stabiler sind als AT-reiche DNA-Sequenzen.

Nach Literatur- und Internet-Recherche fanden wir das Fail Safe PCR PreMix Selection Kit von Epicentre Biotechnologies. Laut Hersteller werden durch den vorgefertigten Master Mix (bestehend aus gepufferter NaCl-Lösung mit allen vier dNTPs, MgCl₂, PCR-Enhancer mit Betaine) sowie seiner zwölf verschiedenen Fail Safe PCR PreMixes stabile Reaktionsbedingungen gewährleistet. Mit Hilfe spezifischer Transkriptionenhancer und Zusätzen wie Betaine verspricht der Hersteller selbst bei sehr komplexen Zielsequenzen eine präzise DNA-Amplifikation.

Wir hielten uns folglich streng an das Protokoll des PCR Purification KITs und passten die Einstellungen der Thermocycler den jeweils verwendeten Primern für IL28B sowie rs 12979860 an. Anschließend testeten wir die verschiedenen PCR PreMixes.

Dabei erzielten wir bezüglich rs 12979860neu mit Puffer J und bezüglich IL28Bneu bei Zugabe von Puffer G die stabilsten PCR- sowie besten Gelelektrophorese-Ergebnisse (siehe Abbildungen Nr. 3 und Nr. 4).

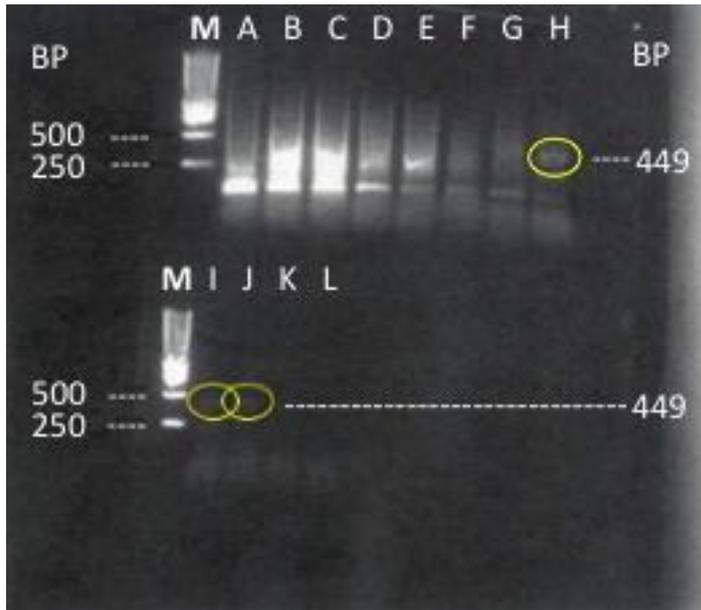


Abbildung Nr. 3:

Darstellung der Fail Safe KIT PCR-Produkte (Primer rs 12979860neu) mittels Agarosegelelektrophore (1,5%):

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-H= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes A-H: Fail Safe KIT PCR-Produkte unter Verwendung der Fail Safe PreMixe mit Puffer A-H

Gelb markiert: gewünschtes PCR-Produkt mit einer DNA-Länge von 449 Basenpaaren

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-L= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes I-L: Fail Safe KIT PCR-Produkte unter Verwendung der Fail Safe PreMixe mit Puffer I-L

Gelb markiert: gewünschtes PCR-Produkt mit einer DNA-Länge von 449 Basenpaaren

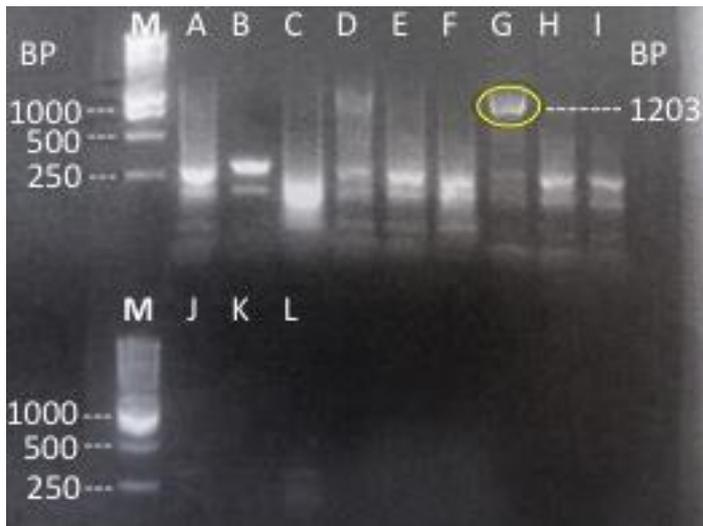


Abbildung Nr. 4:

Darstellung der Fail Safe KIT PCR-Produkte (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%):

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-I= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes A-I: Fail Safe KIT PCR-Produkte unter Verwendung der Fail Safe PreMixe mit Puffer A-I

Gelb markiert: gewünschtes PCR-Produkt mit einer DNA-Länge von 1203 Basenpaaren

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-L= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes J-L: Fail Safe KIT PCR-Produkte unter Verwendung der Fail Safe PreMixe mit Puffer J-L

Bevor wir nun das gesamte Patientenkollektiv amplifizierten, testeten wir noch verschiedene Primer, welche bereits zuvor im Rahmen der klassischen PCR nach Sanger verwendet wurden. Die damals erfolgreichsten Primer neuneu und rs1297neu erzielten auch im Fail Safe KIT gute Resultate. Hinsichtlich rs1297neu ergaben sich allerdings mehrfach Doppelbanden in der Gelelektrophorese.

Nach Austausch durch den HPSF-Primer erreichten wir dann durchgehend klar definierte einzelne Banden. Tatsächlich gelang es uns so mit Hilfe des Fail Safe KIT für alle 93 Studienteilnehmer PCR-Produkte mit ausreichend hohem DNA-Gehalt herzustellen. In der Agarosegelelektrophorese zeigten sich konsekutiv bei Verwendung des HPSF- sowie des IL28Bneu-Primers korrekt platzierte, einzelne scharf begrenzte Banden (siehe Abbildungen Nr. 5 und Nr. 6).



Abbildung Nr. 5:

Darstellung der Fail Safe KIT PCR-Produkte (Primer HPSF, Puffer J) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%): exemplarische Darstellung (Patient 1-16) für das gesamte Patientenkollektiv

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-8= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 1-8: gewünschte Fail Safe KIT PCR-Produkte (449 Basenpaare lang) bei Studienpatienten 1-8

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-16= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 9-16: gewünschte Fail Safe KIT PCR-Produkte (449 Basenpaare lang) bei Studienpatienten 9-16



Abbildung Nr. 6:

Darstellung der Fail Safe KIT PCR-Produkte (Primer IL28Bneu, Puffer G) mittels Agarosegelelektrophore (1,5%): exemplarische Darstellung (Patient 69-88) für das gesamte Patientenkollektiv

Obere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-79= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 69-79: gewünschte Fail Safe KIT PCR-Produkte (1203 Basenpaare lang) bei Studienpatienten 69-79

Untere Gelhälfte:

BP= Basenpaare; M-88= Lanes

Lane M (= Marker): Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas #SM1168)

Lanes 80-88: gewünschte Fail Safe KIT PCR-Produkte (1203 Basenpaare lang) bei Studienpatienten 80-88

Nach erneuter Aufarbeitung mit einem von LGC gelieferten Vorbereitungs-KIT konnten wir die zuvor gewonnenen PCR-Produkte zur Sequenzierung versenden. Als Ergebnis erhielten wir von LGC schließlich Sequenzdaten der jeweiligen DNA-Abschnitte in Form einer Pseudogelelektrophorese, eines Kurvendiagrammes sowie einer elektronischen Darstellung (siehe Abbildungen Nr. 7-10).

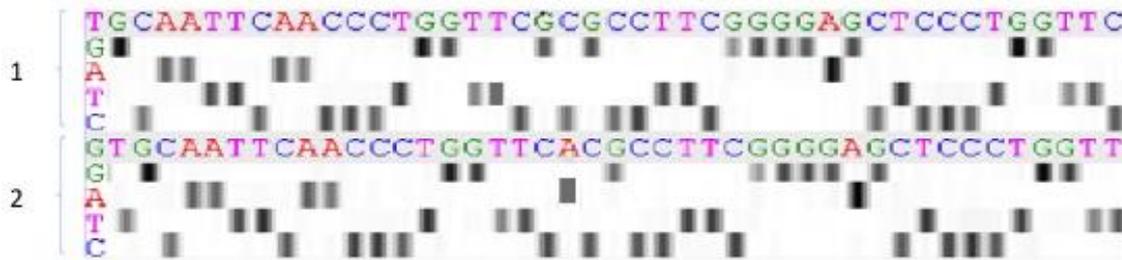


Abbildung Nr. 7:

Exemplarische Darstellung (Pseudogeleelektrophorese) eines Auszuges des sequenzierten DNA-Abschnittes von zwei willkürlich ausgewählten Studienteilnehmern (Patient 1, 7):

1= Patient 1:

obere Spalte (grau hinterlegt): Basenabfolge (T=Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, A= Adenin)

untere Spalte (weiß hinterlegt): Kurvendiagramm (rosa= Thymin, grün= Guanin, blau= Cytosin, rot= Adenin)

2= Patient 7:

obere Spalte (grau hinterlegt): Basenabfolge (T=Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, A= Adenin)

untere Spalte (weiß hinterlegt): Kurvendiagramm (rosa= Thymin, grün= Guanin, blau= Cytosin, rot= Adenin)



Abbildung Nr. 8:

Exemplarische Darstellung (Kurvendiagramm) eines Auszuges des sequenzierten DNA-Abschnittes von drei willkürlich ausgewählten Studienteilnehmern (Patient 1, 7, 8):

1= Patient 1:

obere Spalte (grau hinterlegt): Basenabfolge (T=Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, A= Adenin)

untere Spalte (weiß hinterlegt): Kurvendiagramm (rosa= Thymin, grün= Guanin, blau= Cytosin, rot= Adenin)

2= Patient 7:

obere Spalte (grau hinterlegt): Basenabfolge (T=Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, A= Adenin)

untere Spalte (weiß hinterlegt): Kurvendiagramm (rosa= Thymin, grün= Guanin, blau= Cytosin, rot= Adenin)

3= Patient 8:

obere Spalte (grau hinterlegt): Basenabfolge (T=Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, A= Adenin)

untere Spalte (weiß hinterlegt): Kurvendiagramm (rosa= Thymin, grün= Guanin, blau= Cytosin, rot= Adenin)

In orange: IL28B, getrennt durch Introns

In lila: rs 28416813 und rs 8103142

In blau Polymorphismen: G>C Transition in rs 28416813

AAG>AGG Transition: Lys>Arg in rs8103142

Anhand der charakteristischen Basenabfolge und der spezifischen Lokalisation wurden im nächsten Schritt die spezifischen Transitionen der drei SNPs mittels einem kostenlosen Programm namens Seq Assem aufgesucht (für rs 28416813 eine G→C-Transition, für rs 8103142 eine Lysin→ Arginin-Transition, für rs 12979860 eine CC-gegenüber CT- oder TT-Basenpaarung). Die einzelnen Transitionen wurden anschließend für jeden einzelnen Teilnehmer aufgelistet und dienten später als Grundlage für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Genom und Verträglichkeit bzw. SVR der antiviralen interferonbasierten Hepatitis-C-Therapie. Anschließend wurden die drei SNPs mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes statistisch analysiert (siehe Erläuterungen im Methodenteil) und die Genotypenverteilung jeweils tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabellen Nr. 15-17).

Genpolymorphismus (rs 28416813)

rs2841	Mittelwert	Standardabweichung	N
Cc	3,23	3,224	30
Cg	3,39	2,921	56
Gg	2,86	3,024	7
Gesamt	3,30	2,999	93

Tabelle Nr. 15: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 28416813.

Genpolymorphismus (rs 8103142)

rs8103	Mittelwert	Standardabweichung	N
A	3,37	3,028	63
G	3,17	2,984	30
Gesamt	3,30	2,999	93

Tabelle Nr. 16: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 8103142.

Überprüfung des Hardy-Weinberg-Kriteriums nicht möglich (Ergebnisse nicht in Form der Angabe von Allelfrequenzen und Genotypenverteilung darstellbar) .

Genpolymorphismus (rs 12979860)

IL28B	Mittelwert	Standardabweichung	N
Cc	2,60	2,554	30
Ct	3,50	2,826	46
Tt	4,00	3,984	17
Gesamt	3,30	2,999	93

Tabelle Nr. 17: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 12979860.

3.2 Dauerhaftes virologisches Ansprechen/SVR- Raten der verschiedenen

Genotypvarianten des SNP rs 12979860 im Würzburger Patientenkollektiv

Durch Vergleich der verschiedenen Genotypvarianten CC, CT und TT mit den dazugehörigen Ergebnissen bzgl. einer vorliegenden SVR sechs Monate nach Beendigung der antiviralen Behandlung konnten die Zusammenhänge zwischen Genom und Therapieansprechen untersucht werden.

In der Würzburger Studie betrugen die SVR-Raten des Patientenkollektivs 76,7% für die Genotypvariante C/C, 56,5% für die Genotypvariante C/T und 58,8% für die Genotypvariante T/T (siehe Abbildung Nr. 11).

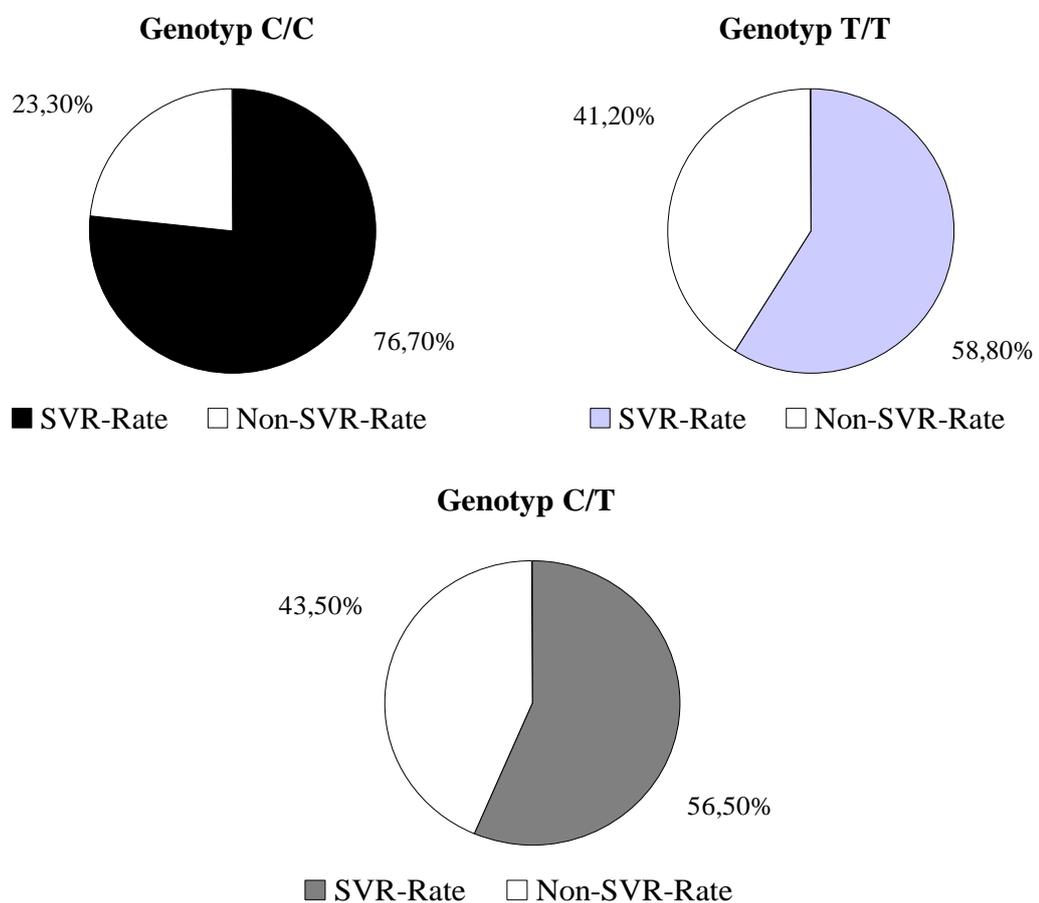


Abbildung Nr. 11.

Darstellung der Sustained Virological Response (SVR) Raten der drei Genotypvarianten des SNP rs 12979860 im Würzburger Patientenkollektiv

3.3 Zusammenhang zwischen der interferonassoziierten depressiven Symptomatik und den drei untersuchten genetischen Polymorphismen

Um den Einfluss der Interferontherapie auf die depressive Symptomatik untersuchen zu können, wurde zunächst die Veränderung der HADS-Gesamtscores im Therapieverlauf berechnet. Die ursprünglichen Punkte vor Beginn der Therapie wurden mit den Messzeitpunkten vier, 12 und 24 Wochen unter laufender antiviraler Behandlung, zum Zeitpunkt des Therapieabschlusses sowie im Verlauf von vier bzw. 24 Wochen nach Beendigung der Therapie verglichen. So konnte durch Subtraktion des Ausgangswertes vor Therapiebeginn vom jeweils maximalen Gesamtscore im Verlauf der genannten Messzeitpunkte der maximale Anstieg, das heißt, die größte Differenz im HADS-Gesamtscore ermittelt werden.

Die mittleren Veränderungen der Depressionsscores im Verlauf der antiviralen Therapie wurden mittels einfaktorieller Varianzanalysen auf signifikante Genotypen-assoziierte Gruppenunterschiede geprüft. Die aus diesen inferenzstatistischen Analysen erhaltenen p-Werte gaben dann Auskunft darüber, ob sich die Veränderungen der Gesamtpunktzahl bei den verschiedenen Genotypvarianten signifikant unterschieden ($p < 0,05$) oder nicht ($p \geq 0,05$). Der p-Wert steht dabei für die Irrtumswahrscheinlichkeit, dass eine angenommene Hypothese (in unserem Fall dass ein Zusammenhang zwischen Genom und Verträglichkeit einer antiviralen interferonbasierten Hepatitis-C-Therapie bestehe) auch für die Grundgesamtheit zutrifft. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse dieser inferenzstatistischen Auswertung für die drei ausgewählten SNPs dargestellt.

1.) SNP: rs 12979860

Der mittlere Anstieg der Scores im Therapieverlauf für die Subskala „Depressivität“ im HADS betrug beim Genotyp C/C $2,6 \pm 2,5$, bei C/T $3,5 \pm 2,8$ und bei T/T $4,0 \pm 3,9$ (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen: $p=0,253$). Das bedeutet, dass im Therapieverlauf Patienten mit dem Genotyp CC im Schnitt insgesamt 2,6 mehr Punkte angaben als noch vor Beginn der Interferontherapie. Beim Genotyp CT betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 3,5, beim Genotyp TT im Schnitt sogar 4,0 Punkte mehr, verglichen mit der Gesamtpunktzahl vor Therapiebeginn. Die univariate Varianzanalyse ergab einen p-Wert von 0,253 (siehe Abbildung Nr. 12).

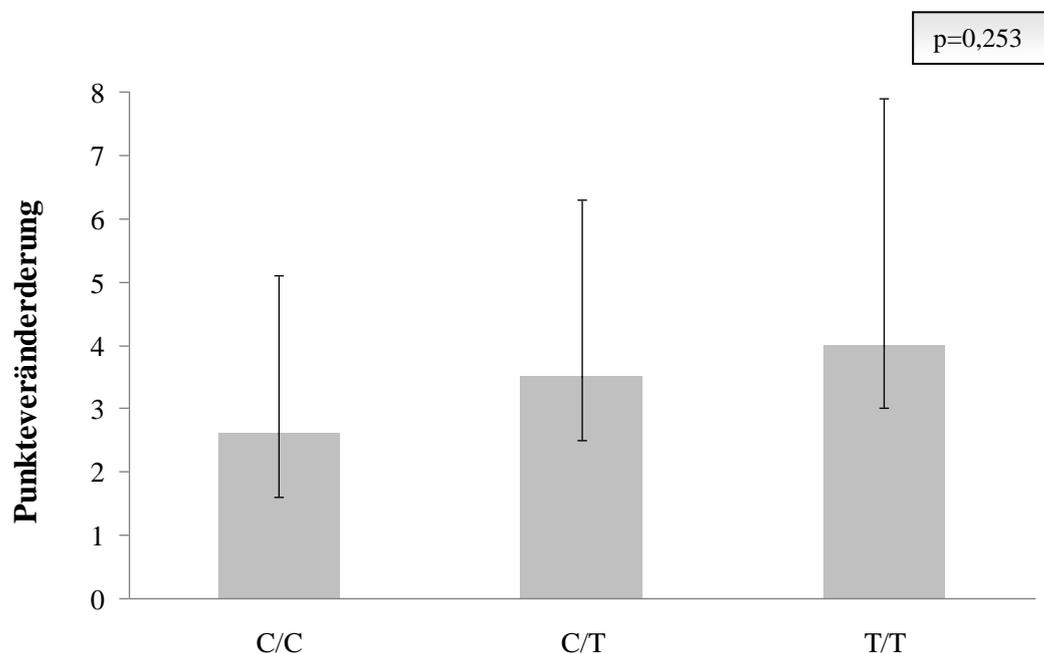


Abbildung Nr. 12:

Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die drei Genotypvarianten (C/C, C/T, T/T) des SNP rs 12979860

2.) SNP: rs 28416813

Der mittlere Anstieg der Scores im Therapieverlauf für die Subskala „Depressivität“ im HADS betrug beim Genotyp C/C $3,23 \pm 3,2$, bei C/G $3,39 \pm 2,9$ und bei G/G $2,86 \pm 3,0$ (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen: $p=0,897$). Das bedeutet, dass im Therapieverlauf Patienten mit dem Genotyp CC im Schnitt insgesamt 3,23 mehr Punkte angaben als noch vor Beginn der Interferontherapie. Beim Genotyp CG betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 3,39, beim Genotyp GG im Schnitt 2,86 Punkte mehr, verglichen mit der Gesamtpunktzahl vor Therapiebeginn. Die univariate Varianzanalyse ergab einen p-Wert von 0,897 (siehe Abbildung Nr. 13).

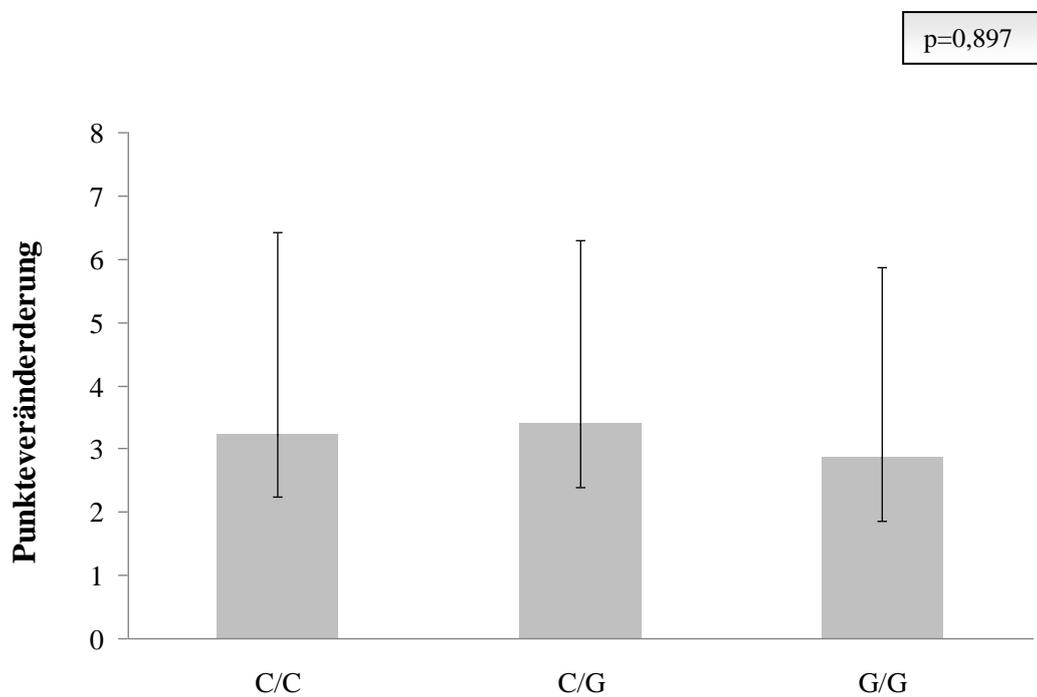


Abbildung Nr. 13:

Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die drei Genotypvarianten (C/C, C/G, G/G) des SNP rs 28416813

3.) SNP: rs 8103142

Der mittlere Anstieg der Scores im Therapieverlauf für die Subskala „Depressivität“ im HADS betrug beim Genotyp AAG $3,37 \pm 3,0$ und beim Genotyp AGG $3,17 \pm 3,0$. (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen: $p=0,767$). Das bedeutet, dass im Therapieverlauf Patienten mit dem Genotyp AAG im Schnitt insgesamt 3,37 mehr Punkte angaben als noch vor Beginn der Interferontherapie. Beim Genotyp AGG betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 3,17 Punkte mehr, verglichen mit der Gesamtpunktzahl vor Therapiebeginn. Die univariate Varianzanalyse ergab einen p-Wert von 0,767 (siehe Abbildung Nr. 14).

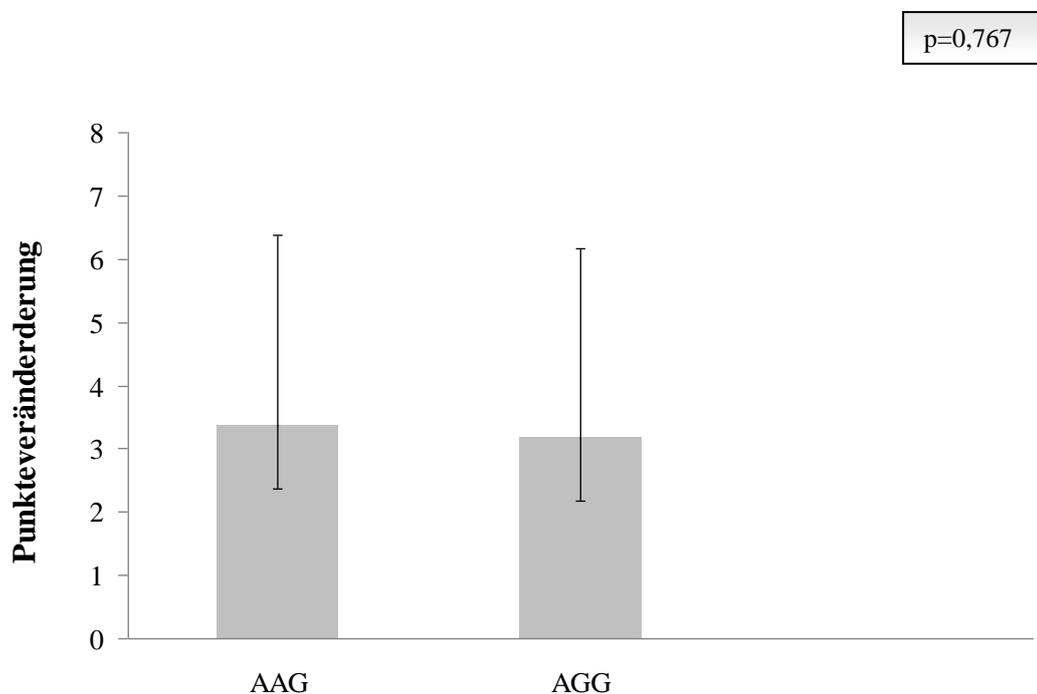


Abbildung Nr. 14:

Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die zwei Genotypvarianten (AAG, AGG) des SNP rs 8103142

3.4 Zusammenhang zwischen den interferonassoziierten Veränderungen der Reaktionszeiten in der TAP und den drei untersuchten genetischen Polymorphismen

Um den Einfluss der Interferontherapie auf die Aufmerksamkeits- bzw. Konzentrationsfähigkeit untersuchen zu können, wurden zunächst die Veränderungen der Reaktionszeiten im TAP berechnet. Die durchschnittlichen Veränderungen ließen sich durch Differenzieren der jeweiligen Gesamtpunktzahl nach und vor Interferongabe berechnen. Durch Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Genotypvarianten wurde dann erneut der zugehörige p-Wert kalkuliert.

Zunächst wurde der mittlere Anstieg der Reaktionszeiten im Therapieverlauf für die Subtests Alertness sowie Vigilanz berechnet. Dabei betrug die durchschnittliche Reaktionszeitveränderung aller drei SNPs bezüglich Alertness 52,3 Sekunden. Bei der Untersuchung der therapiebedingten Auswirkungen auf die Vigilanz zeigte sich im Schnitt eine um 83,0 Sekunden verlängerte Reaktionszeit.

Die Resultate der statistischen Berechnungen für die beiden ausgewählten TAP-Testverfahren Alertness und Vigilanz sollen im Folgenden schrittweise für jedes der drei Polymorphismen veranschaulicht werden.

1.) SNP: rs 12979860

Die durchschnittliche Reaktionszeitdifferenz beim Subtest Alertness betrug beim Genotyp C/C $56,39 \pm 89,3$ Sekunden, bei C/T $50,05 \pm 60,0$ Sekunden und bei T/T $51,24 \pm 54,4$ Sekunden. Das bedeutet, dass im Therapieverlauf Patienten mit dem Genotyp C/C im Schnitt insgesamt 56,39 Sekunden mehr benötigten als noch vor der Behandlung mit Interferon alpha. Beim Genotyp C/T betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 50,05 Sekunden, beim Genotyp T/T im Schnitt 51,24 Sekunden mehr, verglichen mit der Gesamtreaktionszeit noch vor Therapiebeginn. Die univariate Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) ergab einen p-Wert von 0,927.

Beim Subtest Vigilanz konnten folgende Auswirkungen der Interferontherapie beobachtet werden: Die Reaktionszeit beim Genotyp C/C nahm im Durchschnitt um $79,59 \pm 77,6$ Sekunden zu. Beim Genotyp C/T betrug die Veränderung im Schnitt $74,16 \pm 78,9$ Sekunden und beim Genotyp T/T sogar $112,65 \pm 96,97$ Sekunden. Anhand der univariaten Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) wurde ein p-Wert von 0,253 ermittelt (siehe Abbildung Nr. 15).

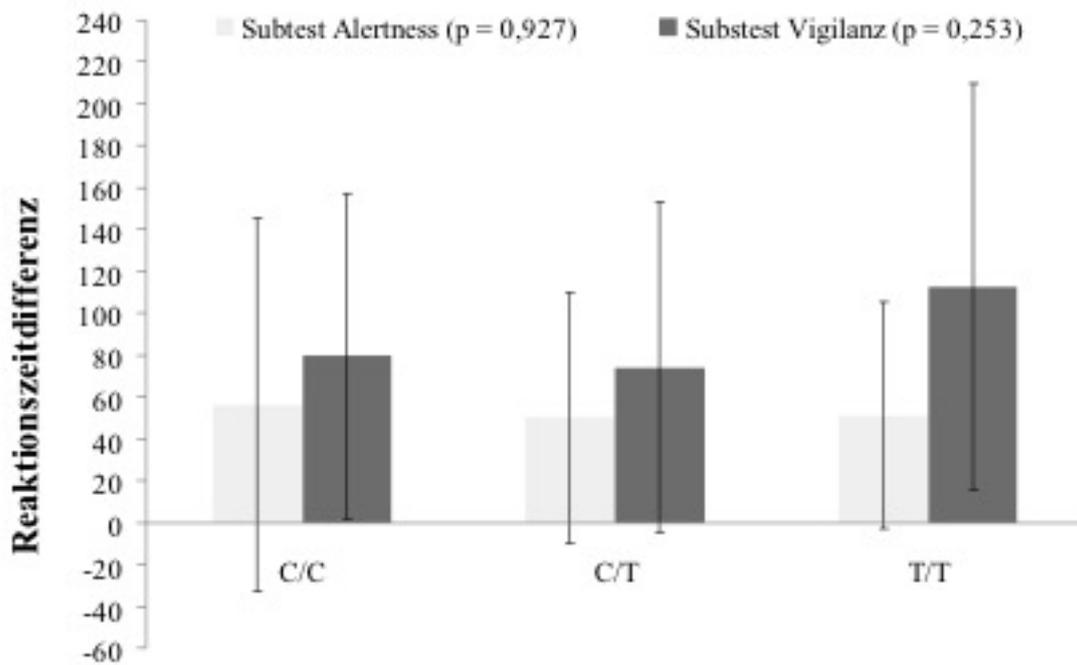


Abbildung Nr. 15:

Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die drei Genotypvarianten (C/C, C/T, T/T) des SNP rs 12979860.

2.) SNP: rs 28416813

Die durchschnittliche Reaktionszeitdifferenz beim Subtest Alertness betrug beim Genotyp C/C $54,34 \pm 78,8$ Sekunden, bei C/G $51,70 \pm 66,2$ Sekunden und bei G/G $48,69 \pm 58,7$ Sekunden. Das heißt, dass Patienten vom Genotyp C/C im Verlauf der Interferonbehandlung durchschnittlich 54,34 Sekunden mehr benötigten als noch vor Therapiebeginn. Beim Genotyp C/G betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 51,70 Sekunden, beim Genotyp G/G im Schnitt 48,69 Sekunden mehr,

verglichen mit der Gesamtreaktionszeit noch vor Therapiebeginn. Die univariate Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) ergab einen p-Wert von 0,976.

Im Subtest Vigilanz zeigten sich folgende Auswirkungen der Interferontherapie: Die Reaktionszeit beim Genotyp C/C nahm im Durchschnitt um $98,44 \pm 72,5$ Sekunden zu. Beim Genotyp C/G betrug die Veränderung im Schnitt $69,16 \pm 82,6$ Sekunden und beim Genotyp G/G gar $126,15 \pm 105,3$ Sekunden. Anhand der univariaten Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) wurde ein p-Wert von 0,103 ermittelt (siehe Abbildung Nr. 16).

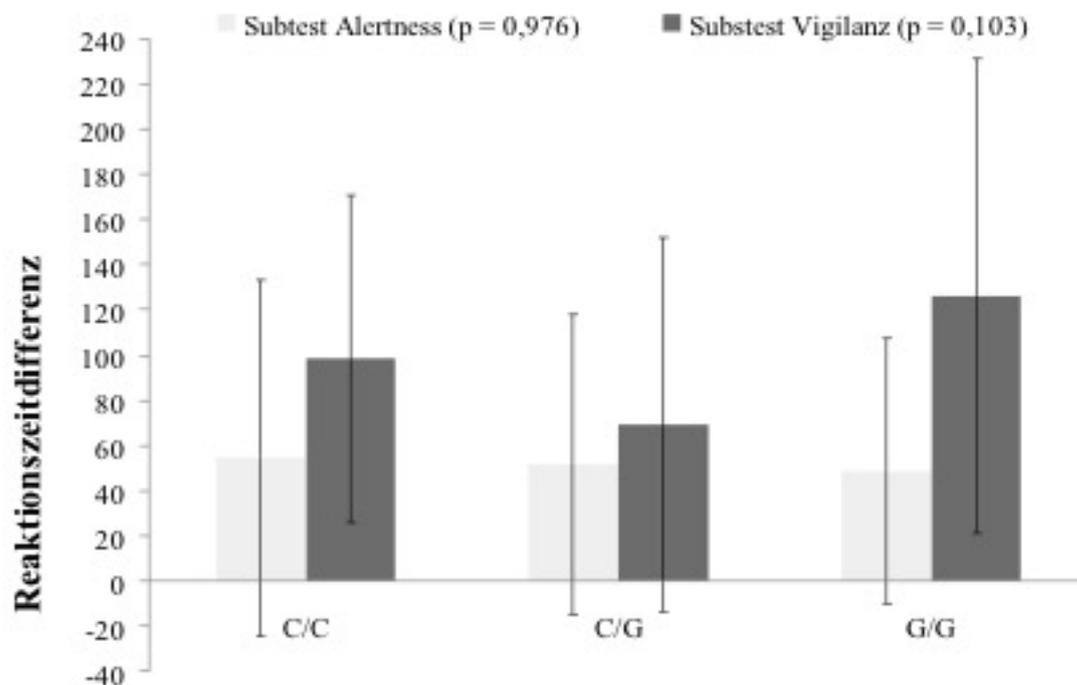


Abbildung Nr. 16:

Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die drei Genotypvarianten (C/C, C/G, G/G) des SNP rs 28416813.

3.) SNP: rs 8103142

Die durchschnittliche Reaktionszeitdifferenz beim Subtest Alertness betrug beim Genotyp AAG $46,72 \pm 62,9$ Sekunden und beim Genotyp AGG $64,54 \pm 81,6$ Sekunden. Das bedeutet, dass im Therapieverlauf Patienten mit dem Genotyp AAG im Schnitt 46,72 Sekunden mehr benötigten als noch vor der Behandlung mit Interferon alpha. Beim Genotyp AGG betrug die Veränderung im Therapieverlauf im Schnitt 64,54 Sekunden mehr im Vergleich mit der Gesamtreaktionszeit noch vor Beginn der Interferontherapie. Die univariate Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) ergab einen p-Wert von 0,254.

Im Subtest Vigilanz präsentierten sich die Auswirkungen der Interferontherapie wie folgt: Die Reaktionszeit beim Genotyp AAG nahm im Durchschnitt um $72,91 \pm 77,2$ Sekunden zu. Beim Genotyp AGG betrug die Veränderung im Schnitt sogar $105,07 \pm 90,2$ Sekunden. Anhand der univariaten Varianzanalyse (Unterschied zwischen den genotypbasierten Subgruppen) wurde ein p-Wert von 0,082 ermittelt (siehe Abbildung Nr. 17).

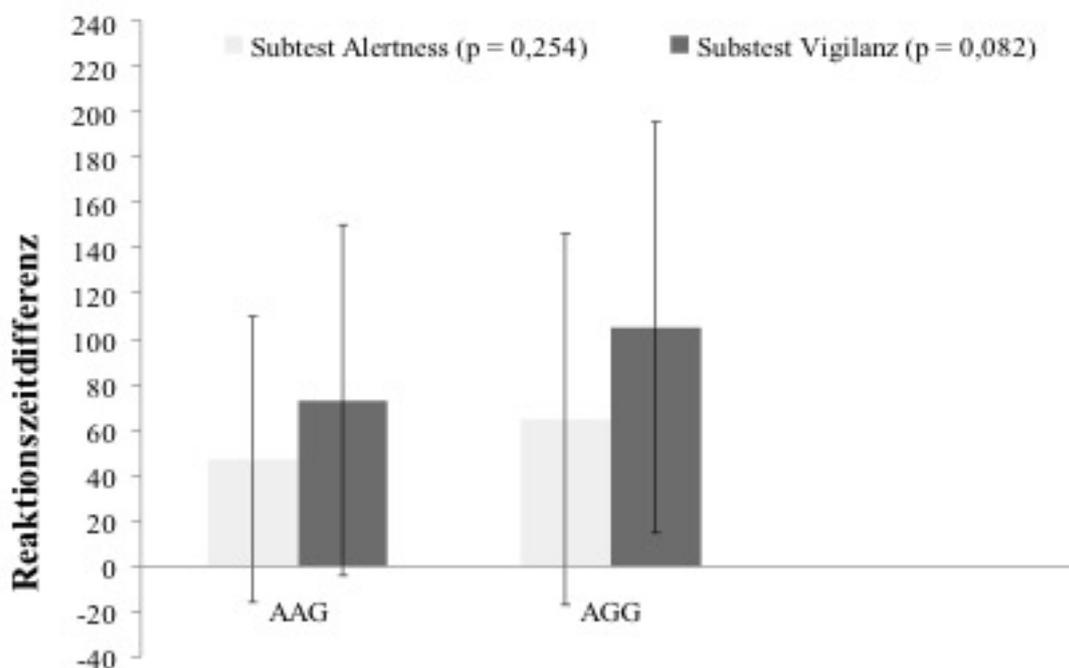


Abbildung Nr. 17:

Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die zwei Genotypvarianten (AAG, AGG) des SNP rs 8103142.

4. Diskussion

4.1 Fehlerquellen und Optimierungsansätze der DNA-Sequenzierung mittels herkömmlicher PCR-Methode nach Sanger

Fehlerquellen:

Neben der Amplifikation der Ziel-DNA kann es bei der herkömmlichen Sequenzierung nach Sanger (unter anderem durch übermäßige PCR-Zyklen oder Fehler der Polymerasen) auch zur Vervielfältigung unspezifischer PCR-Produkte kommen (134, 135). Ein anderes Problem stellen falsch-positive Ergebnisse dar. Hierbei handelt es sich um unerwünschte PCR-Produkte, die aus Kontaminationen mit Fremd-DNA (Übertragung über Luft oder Haut durch Laboranten) oder aus Verunreinigungen von vorangegangenen PCR-Ansätzen in Form eines Carry-Overs resultieren (136, 137). Außerdem kann es beim Arbeiten mit mehreren Proben zu Kreuzkontaminationen einzelner Nukleinsäuren kommen. Auch Staubpartikel oder Aerosole, welche beim Pipettiervorgang entstehen, können bereits für eine relevante Verunreinigung verantwortlich sein.

Weitere Schwierigkeiten der PCR ergeben sich durch falsch-negative Ergebnisse. Neben Pipettierfehlern oder Lagerungsschäden der Reagenzien spielen vor allem Mismatch-Basenpaarungen des verwendeten Primers eine limitierende Rolle (138).

Optimierungsansätze:

Um das Kontaminationsrisiko mit DNA-Templates von außen zu minimieren, wurde höchster Wert auf die Arbeitsplatzhygiene, räumliche Trennung der einzelnen Arbeitsschritte sowie Verwendung automatischer Abwurfpipetten mit Aerosolbarrierefiltern gelegt. Mittels Blood & Tissue-Kit ermittelten wir, bei welcher Blutserummenge wir optimale DNA-Konzentrationen erhielten. Bezüglich der Primermenge achteten wir darauf, einen quantitativen Überschuss gegenüber der beiden Zielstränge im initialen Reaktionsansatz zu erzielen. Hierdurch war die Wahrscheinlichkeit einer Hybridisierung höher als die eines Reannealings der beiden Einzelstränge. Bei Steigerung des Primers über 1µl nahm die PCR-Effizienz durch Bildung inaktivierender Primerdimere jedoch wieder ab (138).

Durch Verwendung thermostabiler Taq-Polymerasen mit bereits integrierter Reverse-Transkriptase-Aktivität konnten wir sowohl Zeitaufwand als auch Kontaminationsrisiko reduzieren und die DNA-Ausbeute erhöhen.

Durch eine Grundaktivität bereits bei Raumtemperatur können Polymerasen durch vorzeitigen Abfall vom Zielfragment zur Amplifikation verkürzter Stränge führen.

Solche Fehlampifikationen versuchten wir durch sogenannte Hotstart-Reaktionen zu vermeiden. Hierbei wird die Polymerase durch Substanzen wie Wachs oder Antikörper räumlich abgeschirmt und erst im Rahmen der Denaturierungserwärmung wieder separiert und somit aktiviert (138, 139).

Des Weiteren versuchten wir durch Variieren der Annealingtemperaturen sowie der Magnesiumkonzentrationen die PCR-Ausbeute zu optimieren. Als metabolischer Kofaktor ermöglicht Magnesium sowohl das Primerannealing als auch die enzymatische Aktivität der Polymerasen zu verbessern. Dieser positive Effekt wird bei einem deutlichen Überschuss an freien Magnesiumionen allerdings durch die Produktion unspezifischer PCR-Produkte limitiert (140). So konnten wir die PCR-Ausbeute durch eine Erhöhung des Magnesiums auf über 2 µl nicht mehr verbessern.

Neben Verwendung von Reaktionspuffern mit ausreichend hohem Ausgangs-pH achteten wir auch auf Konzentration und Qualität (<1,5% Methylierungen) der verwendeten Nukleotide (140). Mit Erhöhung der Magnesiumkonzentration wirkte sich zunächst auch eine Steigerung der Nukleotidkonzentration positiv aus. Allerdings wird durch Reduktion der freien Magnesiumionen indirekt die Polymeraseaktivität sowie die Rate der Primeranlagerungen erneut reduziert (138). Diesen Effekt versuchten wir bei Steigerungen der Nukleotidkonzentrationen durch Variation der Magnesiummengen zu verhindern und insgesamt die Vorteile einer erhöhten Nukleotidkonzentration bei ausreichender Menge freier Magnesiumionen auszunutzen.

4.2 Gründe für die Umstellung auf den Fail Safe PCR Enzyme Mix

Trotz zahlreicher Versuche einer Prozessoptimierung der Reaktionsansätze der klassischen PCR gelang es insgesamt nicht, ausreichende beziehungsweise stabile DNA-Konzentrationen zu erhalten und somit die notwendige Grundlage für eine erfolgreiche Sequenzierung zu schaffen. Daher entschieden wir uns parallel mit dem damals neu auf dem Markt erschienenen Fail Safe Kit zu arbeiten.

Aufgrund der Tatsache, dass der Fail Safe PCR PreMix Selection Kit verglichen mit der alleinigen Taq-Polymerase eine mindestens dreifach höhere Genauigkeit und Wiedergabetreue bietet, sind die erhaltenen PCR-Produkte auch für downstream Applikationen geeignet (wie sie zum Beispiel beim Klonen und Sequenzieren oder bei Expressions- und Mutationsanalysen zur Anwendung kommen).

Der Fail Safe PCR Enzyme Mix ist ein Enzymgemisch mit einem von 3' nach 5' ablesenden Reparaturenzym, das eine hohe Genauigkeit gewährleistet. Die 12 FailSafe PCR 2X PreMixes beinhalten eine speziell gepufferte Salzlösung mit allen vier dNTPs, unterschiedlichen Konzentrationen von MgCl₂ sowie diversen Transkriptionenhancern. Diese Transkriptionenhancer beeinflussen die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promoter und verstärken auf diese Weise die Transkriptionsaktivität eines Gens. Entscheidend hierbei ist die spezielle räumliche Anordnung des Verstärkers zum Promoter. So kann der Verstärker zum Teil mehrere tausend Basen vor (upstream) beziehungsweise hinter (downstream) dem Promoter platziert sein und dennoch aufgrund der dreidimensionalen Supercoil-Struktur der DNA in die räumliche Nähe der Promotersequenz gebracht werden.

Zusätzlich beinhaltet der Fail Safe PCR Enzyme Mix die Substanz Betaine (Trimethylglycin).

Dieses bewirkt eine wesentliche Verbesserung bezüglich Ausbeute und Spezifität bei der Amplifikation vieler Zielsequenzen, insbesondere wenn diese einen hohen GC-Gehalt oder komplizierte Sekundärstrukturen enthalten. Des Weiteren gelingt es durch Betaine die PCR zu verstärken, indem es die DNA-Polymerasen vor thermaler Denaturierung schützt. Insgesamt führen die standardisierten und bereits fertigen Gemische zu einer Fehlerreduktion. Neben individuellen Fehlern oder Ungenauigkeiten beim Pipettieren mit daraus resultierenden Mischungsfehlern lässt sich auch das Risiko für Kontaminationen, Temperaturschädigungen oder ungünstigen Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Einzelsubstanzen verhindern.

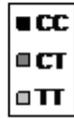
Nach Ermittlung des geeigneten Pre-Mixes gelang es anschließend mit Hilfe des Fail-Safe-Kits für das gesamte Patientenkollektiv bestehend aus 93 Hepatitis-C-Patienten eine beständige und zuverlässige DNA-Amplifikation mit anschließender Sequenzierung zu erreichen.

4.3 Bewertung der Würzburger Studie hinsichtlich eines für die mitteleuropäische Gesamtbevölkerung repräsentativen Patientenkollektivs

Eine der Schwierigkeiten wissenschaftlicher Arbeiten ist die häufig zu geringe Stichprobenzahl, wodurch eine Übertragung der Ergebnisse auf die Gesamtbevölkerung im Sinne der Repräsentationsfähigkeit oft kaum möglich und dadurch der tatsächliche Stellenwert der gewonnenen Ergebnisse meist kritisch begutachtet werden muss.

Aus diesem Grund wurde die Genotypenverteilung des Würzburger Patientenkollektivs mit der Genotypenverteilung einer Studie von Dongliang Ge et al. aus dem Jahr 2009 verglichen. Bei dieser Studie konnte bei einer wesentlich höheren Teilnehmerzahl von 871 Personen das Vorliegen eines mitteleuropäischen Durchschnittskollektivs ermittelt werden. Wie der schematische Vergleich der Genotypenverteilungen beider Arbeiten zeigt, konnte auch in der Würzburger Studie (auch dank einer Stichprobenzahl von 93 Studienteilnehmern) ein für die Gesamtbevölkerung repräsentatives Ergebnis erzielt werden (siehe Abbildung Nr. 18).

Hierbei zeigte das Patientenkollektiv der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit folgende Genotypenverteilung: bei 32,2 % der untersuchten Personen lag der Genotyp C/C, bei 49,5% der Genotyp C/T und bei 18,3 % der Genotyp T/T vor (siehe Tabelle Nr. 18).



Genpolymorphismus IL28B

Genotypenverteilung in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit/Würzburger Studie

n = 93



Genpolymorphismus IL28B

Genotypenverteilung in Dongliang Ge et al. (09/2009)

n = 871

Abbildung Nr. 18: Graphischer Vergleich der Genotypenverteilungen der Würzburger Studie und der Studie von Dongliang Ge et al. (2009)

Die beobachteten Genotypen- und Allelfrequenzen waren in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($\chi^2(1)=0.007$; $P=0.931$).

		C/C	C/T	T/T
Würzburger				
Studie	93	30	46	17
	%	32,2	49,5	18,3
Dongliang Ge				
et al.	871	336	433	102
	%	38,5	49,7	11,7

Tabelle Nr. 18: Tabellarischer Vergleich der Genotypenverteilungen der Würzburger Studie und der Studie von Dongliang Ge et al. (2009)

4.4 Diskussion des Zusammenhangs zwischen Genpolymorphismus und Ansprechen der interferonbasierten antiviralen Hepatitis-C-Behandlung

Dongliang Ge et al. konnte 2009 erstmals einen signifikanten Unterschied der medikamentösen Ansprechrate basierend auf einer unterschiedlichen Genotypenverteilung des SNP IL28B bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion nachweisen. Die SVR stand dabei im Mittelpunkt des Studiendesigns (120). Laut der Arbeit von Dongliang Ge et al. basieren die unterschiedlichen Ansprechraten zu einem Großteil auf den jeweiligen Genotypen des SNP rs 12979860. Dongliang Ge et al. konnte erstmals den CC-Genotyp als prognostisch positiven Marker identifizieren (120). Seither fanden jene Resultate durch eine Reihe vergleichbarer Studiendesigns Bestätigung (141, 124, 125). Auch in unserer Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des C-Allels und einer signifikant höheren SVR aufgezeigt und somit die Resultate von Dongliang Ge et al. bestätigt werden.

Die Ansprechraten des Patientenkollektivs betragen für den CC-Genotyp 76,7%, während Patienten mit Genotyp TT mit 58,8% und CT mit 56,5% wesentlich seltener erfolgreich antiviral therapiert werden konnten.

Zum einen helfen die Resultate unter Berücksichtigung der weltweit unterschiedlichen Genotypenverteilung die Abweichungen beim Therapieansprechen von Patienten verschiedener ethnischer Herkunft zu verstehen. Zum anderen ermöglichen sie schon vor Beginn der Therapieeinleitung eine Aussage bzgl. Wahrscheinlichkeit eines Behandlungserfolgs sowie eine Anpassung von Therapieschema und Therapiedauer je nach genomischer Risikokonstellation.

4.5 Diskussion des Zusammenhangs zwischen Genpolymorphismus und dem Nebenwirkungsprofil einer interferonbasierten, antiviralen Hepatitis-C-Behandlung und Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Studien

Dass generell eine Assoziation zwischen Genom und Medikamentennebenwirkungen bestehen kann, konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf die antivirale interferonbasierte Behandlung chronischer Hepatitis-C-Patienten wurde ein solcher Zusammenhang untersucht. Typische Komplikationen unter laufender Therapie sind Neutropenie, Appetitverlust, Müdigkeit (142). Vor allem aber spielen Auswirkungen auf die Psyche wie Depressionen bis hin zum Selbstmord eine wichtige

Rolle (143). Dieses regelmäßige Auftreten von depressiven Nebenwirkungen unter IFN alpha Therapie lässt einen Einfluss des Medikaments auf die molekularen Entstehungsmechanismen von Depressionen vermuten.

Im Laufe der letzten Jahre konnte der Einfluss spezifischer Genpolymorphismen auf psychiatrische Nebenwirkungen bereits mehrfach aufgezeigt werden. Lotrich stellte den Einfluss genetischer Unterschiede im Serotonin Wiederaufnahme Transporter Promoter 5 HTTLPR auf das inflammatorische System und einem damit assoziierten erhöhtem Depressionsrisiko dar (144). Yoshida postulierte den Zusammenhang zwischen einem Dinukleotiden Mikrosatelliten Polymorphismus des IFN alpha R1 Gens und dem Risiko der Entwicklung depressiver Symptome unter antiviraler interferonbasierter Hepatitis-C-Behandlung (145). Su hingegen untersuchte in diesem Zusammenhang den Einfluss der Phospholipase A2 (146), Kraus die Expression der Allelvariation im 5-HT1A Rezeptor der menschlichen DNA. Er zeigte für eine spezifische homozygote Genvariation HTR1A-1019G eine signifikante Zunahme bezüglich Inzidenz und Schweregrad der interferoninduzierten Depressionen (147).

Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Studien:

Noch vor Veröffentlichung unserer endgültigen Studienergebnisse postulierten Lotrich und Loftis in Ihrer Arbeit erstmals Auswirkungen des Genpolymorphismus IL28B auf die psychischen Nebenwirkungen der antiviralen Behandlung mit Interferon alpha (148). Insgesamt wurden in der Auswertung dieser Studie die Auswirkungen auf Appetit, Schlaf und allgemeines Leistungsvermögen in den Vordergrund gestellt. Hierbei konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem C Allel des Polymorphismus rs 1297860 und verringertem Appetit, Schlafstörungen und Energieverlust im Therapieverlauf aufgezeigt werden ($p < 0,05$). Ein wissenschaftlich signifikanter Zusammenhang zwischen Genpolymorphismus und einem klinisch manifesten Depressionsleiden konnte jedoch analog unserer Würzburger Arbeit letzten Endes nicht nachgewiesen werden ($p = 0,94$).

Eine kritische Begutachtung zeigt, dass der Fokus bei Lotrich und Loftis auf einem einzigen Genpolymorphismus im Bereich von IL28B lag, obwohl Ge, Suppiah, Tanaka und andere 2009 gleich mehrere relevante SNPs in diesem Bereich der DNA

vermuteten. Diese interessanten benachbarten Genpolymorphismen blieben in den Forschungen von Lotrich und Loftis komplett ausgeschlossen.

Auch die Auswahl der drei psychosomatischen Beschwerden in Form von Appetitverlust, Schlafstörungen und vermindertem Leistungsvermögen/Energieverlust ist kritisch zu hinterfragen. Wenngleich alle drei Punkte für die Lebensqualität von Bedeutung zu sein scheinen, bleibt die Frage ob die Verwendung individueller Items von Selbstfragebögen/Skalen eine objektive Bewertung ermöglicht. So kann ein Energieverlust auch mit neurophysiologischen Effekten oder körperlichen Beschwerden wie Blutarmut oder direkten muskulären Störungen zusammenhängen. Auch die Einflüsse auf Appetit, Übelkeit und gastrointestinale Störungen sind sehr viel komplexer und können verschiedenster Herkunft sein.

Auch andere Genpolymorphismen scheinen eine Auswirkung auf die von Lotrich und Loftis gewählten Kriterien zu haben: So beeinflusst ein Polymorphismus in TNF alpha in erster Linie Müdigkeit und Irritabilität (149) während ein Polymorphismus des Serotonin Transporters spezifisch für Depressionen und Schlafstörungen verantwortlich sein könnte (144). So bleibt der tatsächliche Stellenwert des einzelnen, von Lotrich und Loftis untersuchten Genpolymorphismus für die depressive Begleitsymptomatik und dem assoziierten Therapieoutcome insgesamt unklar.

Stattdessen untersuchten wir in unserer Arbeit alle drei von Ge postulierten SNPs im Bereich des Gens IL28B. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Frage, ob eine signifikante Assoziation zwischen Allelfrequenzen in diesem Bereich der DNA und den therapieassoziierten Nebenwirkungen einer interferonbasierten Hepatitis-C-Behandlung besteht. Der Fokus lag dabei auf den beiden Symptomenkomplexen Depressivität und Aufmerksamkeitsdefizite, welche wir aufgrund Ihrer Häufigkeit und Alltagsrelevanz als besonders wichtig erachteten. Bezüglich der Aufmerksamkeitsstörungen bedienten wir uns der Teilergebnisse der Reaktionszeiten des TAP-Testes. Aus Gründen der besseren Praktikabilität, Alltagsrelevanz und Ergebnisse von Voruntersuchungen beschränkten wir unsere Auswertungen auf die beiden Unterpunkte Alertness und Vigilanz. Obwohl die statistische Auswertung zum Teil deutliche Unterschiede der Reaktionszeiten bei den verschiedenen Genotypvarianten aller drei SNPs aufzeigte, konnte insgesamt keine signifikante Korrelation zwischen den therapieassoziierten Aufmerksamkeitsbeziehungweise Konzentrationsdefiziten und der Genotypenverteilung der drei SNPs

nachgewiesen werden. In Bezug auf die depressive Symptomatik nutzten wir die Ergebnisse im HADS-Score. Dabei konzentrierten wir uns bei der Auswertung der Selbstbeurteilungsbögen auf die Subskala Depression, da hier in vorherigen Arbeiten deutlichere Veränderungen sichtbar wurden.

Die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse zeigte diverse Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypvarianten der drei untersuchten SNPs auf. Letzten Endes sprechen die p-Werte jedoch gegen eine signifikante Korrelation zwischen Genotypenverteilung und interferoninduzierter Depressivität.

Eine ganze Reihe von Variablen hat Einfluss auf die SVR. So spielen die basale Viruslast, das Alter und Geschlecht, die Rasse, das Vorliegen einer Leberzirrhose und das Körpergewicht eine wichtige Rolle (150). Außerdem scheinen noch weitere Genpolymorphismen (zum Beispiel die Promotor Region des IL-6 Gens (rs1800795) oder auch das Serotonin Transporter Gen (5-HTTLPR)) Einfluss auf die unerwünschten Medikamentenwirkungen von Interferon alpha zu haben (151).

Zusammenfassend wäre es daher wahrscheinlich nicht nur zu einfach sondern auch falsch einen einzigen Genpolymorphismus als alleine ausschlaggebend für sowohl Therapieansprechen als auch assoziierten Nebenwirkungen zu betrachten.

4.6 Diskussion des Zusammenhangs zwischen den therapieassoziierten

Nebenwirkungen und dem dauerhaften Therapieansprechen

Die Frage ob und wie die Nebenwirkungen einer interferonbasierten antiviralen Hepatitis-C-Therapie den Therapieerfolg beeinflussen, wurde bereits in vielen Studien untersucht. Nicht alle hatten dabei die SVR als Korrelat des Ansprechens definiert. Auch aufgrund von Unterschieden bezüglich der Methodik, zu geringen Teilnehmerzahlen sowie einer heterogenen Bevölkerungsauswahl und unterschiedlichen Behandlungsmaßnahmen ergaben sich leider gegensätzliche oder zumindest nicht exakt miteinander vergleichbare Resultate der bisherigen Studiendesigns.

So konnten Raison, Maddock und Fontana in Ihren Arbeiten aufzeigen, dass der Teil des Patientenkollektivs mit psychiatrischen Nebenwirkungen eine geringe Ansprechrate auf die antivirale Therapie besitzt als der Teil ohne (152, 153, 154). Loftis hingegen postulierte durch seine Studie eine positive Korrelation zwischen therapieassoziierten psychiatrischen Nebenwirkungen und Therapieoutcome (155). Studien von L. Castera

und A. Schäfer konnten diese Resultate nicht bestätigen. Sie fanden weder klinisch noch statistisch signifikante Assoziationen zwischen therapieassoziierten Nebenwirkungen und dem Therapieoutcome (156, 147).

Außerdem standen Schäfers Resultate im Einklang mit anderen Studien die zeigten, dass moderate präexistente psychiatrische beziehungsweise depressive Symptome weder eine Therapiekontraindikation darstellten noch mit schlechteren virologischen Ansprechraten auf die interferonbasierte antivirale Behandlung verknüpft waren (157). Wenngleich man aufgrund der aufgeführten Studienlage eine direkte Assoziation zwischen unerwünschten Interferonnebenwirkungen und SVR-Rate anzweifeln musste, schienen die Nebenwirkungen zumindest indirekt negative Auswirkungen auf den allgemeinen Therapieerfolg haben zu können (158, 83, 84).

Schätzungen zu Folge musste bei nahezu jeder zweiten Patientin unter der antiviralen Kombinationstherapie das ursprünglich geplante Therapieschema verlassen werden. So kam es neben Dosisreduktionen und Anpassungen der Behandlungsdauer nicht selten zu vorzeitigen, endgültigen Therapieabbrüchen.

Eine multidisziplinäre Herangehensweise mit enger Kooperation zwischen Therapiezentrum und Psychologen war notwendig. Neben der Behandlung mit antidepressiven Medikamenten sollte das Hauptaugenmerk auf der Motivation sowie der Stabilisierung der mentalen Verfassung der Patienten liegen, um die Durchführung des strikten und meist langwierigen Therapieschemas zu gewährleisten (159).

5. Ausblick: Interferonfreie, antivirale Therapieoptionen

Durch Entwicklung einer Vielzahl direkt antiviral wirksamer Substanzen wurde die einstige Standardtherapie aus Interferon kombiniert mit Ribavirin in den vergangenen Jahren schrittweise verdrängt. Nochmals verbesserte SVR- und Relapsraten, kürzere Behandlungsdauern und eine insgesamt sehr gute Verträglichkeit stellen die Grundlagen der aktuellen Therapieempfehlungen dar. Alle diese in unterschiedlichen Kombinationen verwendeten Substanzen zeichnen sich durch eine hohe, direkt antivirale Wirksamkeit und Resistenzbarriere aus. Durch die unterschiedlichen Angriffspunkte bei der Virusreplikation in der Wirtszelle wird die Wirkungsstärke der Einzelsubstanzen bei kombinierter Gabe nochmals potenziert. Allgemein lassen sich drei Substanzklassen und damit assoziierte Wirkmechanismen unterscheiden:

1. Proteaseinhibitoren („-previr“) unterbinden durch direkte Hemmung der NS3/4A-Protease die Translation und die Herstellung des HCV-Polyproteins.
2. Nukleotidische und Nichtnukleosidische RNA-Polymerase-Inhibitoren („-buvir“) hemmen durch phosphatgekoppelte- beziehungsweise allosterische Bindung an die NS5B-Polymerase und konsekutivem Kettenabbruch die RNA-Replikation.
3. NS5A-Inhibitoren („-asvir“) behindern die Rekonstruktion des Viriionen sowie deren Transport innerhalb bzw. Freisetzung aus der Wirtszelle

Für die Wahl der geeigneten antiviralen Substanzkombinationen spielen mehrere Faktoren eine Rolle. So sollte man zunächst den vorliegenden HCV-Genotyp ermitteln und prüfen ob zirrhotische Veränderungen der Leber vorliegen beziehungsweise ob es sich um eine kompensierte oder dekomensierte Zirrhose handelt. Außerdem muss zwischen Patienten mit einer antiviralen, interferonbasierten Vorbehandlung und therapie-naiven Patienten unterschieden werden. Bei der Festlegung von Dosis und Dauer der Behandlung können dann individuelle Faktoren wie Viruslast oder Kontraindikationen beziehungsweise negative Prädiktoren gegenüber einzelnen Substanzen ausschlaggebend sein (55).

Standardtherapie der akuten HCV-Infektion ist die Kombination aus Sofosbuvir plus Ledipasvir für 6-8 Wochen mit Eradikationsraten von 100%. Bei chronischen HCV-Infektionen werden basierend auf dem jeweils vorherrschenden Genotyp Therapieempfehlungen gegeben. Demnach werden bei Genotyp 1 zwölfwöchige Kombinationstherapien mit fest vorgeschriebenen Dosierungen der Einzelsubstanzen (Sofosbuvir/Ledipasvir, Sofosbuvir/Velpatasvir, Paritaprevir/Ombitasvir/Dasabuvir, Grazoprevir/Elbasvir) von Kombinationen mit variabler Substanzdosis (Sofosbuvir/Simeprevir, Sofosbuvir/Daclatasvir) unterschieden. Speziell für Subtyp 1a wird die zusätzliche Gabe von Ribavirin zur Kombination Paritaprevir/Ombitasvir/Dasabuvir beziehungsweise Grazoprevir/Elbasvir empfohlen. Bei Genotyp 2 stellt die Kombination Sofosbuvir/Ribavirin und bei Genotyp 3 die Kombination Sofosbuvir/Daclatasvir über jeweils 12 Wochen die Therapie der Wahl dar. Für Infektionen mit Genotyp 4 gelten die gleichen Empfehlungen wie für Typ 1, allerdings wird im Falle der Dreierkombination Dasabuvir durch Ribavirin ersetzt. Die erste und einzige genotypübergreifend wirksame Therapie mit Eradikationsraten zwischen 97-100% stellt die Kombination Sofosbuvir/Velpatasvir dar (55).

Für Patientin mit vorliegender Indikation zur Lebertransplantation oder bereits auf der Warteliste stehenden Patienten stellt sich die Datenlage hinsichtlich der Indikationsstellung einer antiviralen Behandlung komplex dar. Insgesamt sollte hier in enger Absprache mit einem Transplantationszentrum die Vorteile (besserer perioperativer Verlauf, geringere Raten an Infektionen des transplantierten Organs) und Nachteile (Lactatazidosen, medikamentenassoziierte Nebenwirkungen, Verbesserung des MELD-Score und somit geringere Dringlichkeit einer Transplantation) abgewägt werden. Während bei Diagnose eines HCC im kurativen Therapieansatz eine medikamentöse Viruseradikation angestrebt werden sollte, bleibt dessen Nutzen in der palliativen Situation fraglich. Bei Patienten mit Reinfektion des HCV oder Koinfektion mit HIV oder HBV sollten neben der Immunsuppression auch spezifische Medikamenteninteraktionen bei der Therapiewahl berücksichtigt werden. Weitere Besonderheiten ergeben sich bei Vorliegen einer schweren Niereninsuffizienz (antivirale Kombinationen unter Verzicht auf Sofosbuvir) oder bei kindlichen Infektionen (zahlreiche laufende Studien, ggf. dosisreduzierte Kombination aus

Sofosbuvir/Ledipasvir). In der Schwangerschaft bleibt die antivirale Therapie aus Angst vor teratogenen Effekten auch weiterhin kontraindiziert (55).

Wenngleich die neuen Kombinationstherapien insgesamt als sehr gut verträglich bewertet werden, müssen auch hier UAWs beachtet und die Patienten vor Therapiebeginn gut aufgeklärt werden (55).

So muss bei Sofosbuvir neben häufig milder Übelkeit, Kopfschmerzen und Schlafstörungen vor allem auf lebensbedrohliche Bradykardien bei Kombination mit Amiodaron hingewiesen werden. Bei Verwendung von Ledipasvir sollte der Verzicht auf Protonenpumpeninhibitoren besprochen werden, da eine Anhebung des pH-Wertes in einer verminderten Bioverfügbarkeit von Ledipasvir resultiert. Bei Simeprevir sind allgemeine Müdigkeit, Übelkeit, Kopfschmerzen und eine Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung (aufgrund bekannter Photosensitivitätsreaktionen) essentieller Bestandteil des Aufklärungsgesprächs. Generell ist bei NS3/4A-Proteaseinhibitoren in erster Linie aber die laborchemische Überwachung der Transaminasen sowie des Bilirubins zu berücksichtigen und im Falle eines deutlichen Anstiegs aus Gründen der Lebertoxizität ein Therapiewechsel vorzunehmen. Grundsätzlich sollten sämtliche Komedikationen vor Beginn einer antiviralen HCV-Behandlung hinsichtlich möglicher Interaktionen exakt geprüft werden (55).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die neuen antiviralen Therapieoptionen die Heilungschancen und die Lebensqualität der Patienten nochmals verbessern konnten. Auch Patienten nach frustranen, interferonbasierten Behandlungsversuchen haben wieder eine berechtigte Hoffnung auf Heilung ihrer chronischen HCV-Infektion.

Trotz allem sind die Erfahrungen und Langzeitbeobachtungen mit den neuen antiviralen Kombinationen begrenzt. Außerdem ist aufgrund der extrem wandelbaren und anpassungsfähigen Hepatitis-C-Viren auch eine Resistenzentwicklung nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen. Nach wie vor entstehen durch die modernen Therapieregime hohe Behandlungskosten. Insgesamt muss daher die globale Versorgung mit den neuen antiviralen Medikamenten, gerade in Dritte-Welt-Ländern mit besonders hohen HCV-Seroprävalenzraten, auch in Zukunft als limitierender Faktor in der Hepatitis-C-Behandlung gewertet werden. Für diese Menschen sowie für Patienten in palliativer Situation eines hepatozellulären Karzinoms kommt die Hilfe durch die neuen Medikamente wahrscheinlich zu spät.

6. Zusammenfassung

Hauptaugenmerk unserer Arbeit lag auf der Untersuchung der Bedeutung von drei SNPs im Bereich des IL28B-Gens für die Verträglichkeit einer interferonbasierten, antiviralen Kombinationstherapie. Der Vergleich der HADS- beziehungsweise TAPS-Scores zwischen den zuvor durch Sequenzierung ermittelten Varianten der drei untersuchten SNPs ergab deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen der 93 Studienteilnehmer. Insgesamt konnte aber weder hinsichtlich der Ausprägung einer Depressivität noch hinsichtlich der Aufmerksamkeits- und Konzentrationsdefizite eine signifikante Korrelation ermittelt werden.

Des Weiteren verglichen wir in unserer Arbeit die bereits in Vorarbeiten ausgewerteten SVR-Raten der verschiedenen Genotypvarianten. Wie bereits in anderen wissenschaftlichen Arbeiten postuliert, konnten wir die signifikante Korrelation zwischen dem C-Allel im Bereich eines SNP des IL28-Gens und einem besseren Therapieansprechen bestätigen.

Demnach ergibt sich durch eine initiale Genotypisierung chronischer HCV-Patienten die Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit eines anhaltenden Therapieerfolgs konkret abzuschätzen und die individuellen Heilungschancen durch Anpassung des Therapieschemas nochmals zu optimieren.

Aufgrund der nicht signifikanten Assoziation zwischen Genotyp und neuropsychiatrischen Nebenwirkungsprofil sehen wir keine Indikation eine prophylaktische antidepressive Therapie standardmäßig zu empfehlen. Da vermehrte neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter anderen durch verschlechterte Compliance oder Therapieabbrüche den Therapieerfolg indirekt dennoch gefährden, befürworten wir eine individuelle Unterstützung zum Beispiel in Form einer psychotherapeutischen Anbindung.

Die aktuellen interferonfreien Kombinationstherapien basieren auf der Entwicklung einer Vielzahl direkt antiviral wirksamer Substanzen. Durch verbesserte SVR- sowie Relapsraten bei insgesamt geringem Nebenwirkungsprofil haben die neuen Therapieregime die Heilungschancen sowie die Lebensqualität von Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion weiter verbessert.

7. Anhang

7.1 Ethikvotum

Aktenzeichen: 66/10

Studie: Bedeutung eines spezifischen Genpolymorphismus (*IL28B*) für die Verträglichkeit einer Interferontherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion

Ethik-Kommission bei der Medizinischen Fakultät

Versbacher Str. 9

97078 Würzburg

7.2 Patientenaufklärungsbogen

Studientitel:

Bedeutung eines spezifischen Genpolymorphismus (*IL28B*) für die Verträglichkeit einer Interferontherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion

Sehr geehrte/r Patient/in,

Sie wurden gefragt, ob Sie an einer klinischen Untersuchung teilnehmen wollen, bei der untersucht werden soll, ob es einen Zusammenhang zwischen der individuellen Interferonverträglichkeit und einem bestimmten genetischen Merkmal bzw. Marker gibt (SNP *IL28B*). Von diesem so genannten „genetischen Polymorphismus“ ist neueren Forschungsergebnissen zu Folge bekannt, dass er zu einem gewissen Grad den Therapieerfolg im Sinne eines bleibenden virologischen Ansprechens („SVR“) bei der Behandlung der chronischen Hepatitis-C-Infektion vorhersagen kann.

Im Rahmen unserer aktuellen Studie wollen wir nun überprüfen, ob und in welchem Ausmaß dieses genetische Merkmal in Zusammenhang mit dem Auftreten von

kognitiven und anderen psychischen bzw. neuropsychiatrischen Nebenwirkungen während einer Interferontherapie steht.

Um letztendlich zu überprüfen, ob sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von interferoninduzierten kognitiven Beeinträchtigungen (z.B. Konzentrationsstörungen) oder anderer Nebenwirkungen bereits vor Beginn einer antiviralen Behandlung voraussagen lässt und somit die Behandlung und Betreuung der Patienten weiter verbessert und individualisiert werden kann, möchten wir bei Ihnen eine Analyse des oben erwähnten genetischen Merkmals durchführen. Weitere Untersuchungen sind bei Ihnen nicht nötig, da in Ihrem Fall die Verträglichkeit der Interferonbehandlung bereits im Rahmen einer früheren Studie, an der Sie freundlicherweise teilgenommen haben, bereits erfasst und dokumentiert wurde.

Aus diesem Grund soll bei Ihnen bei einer Routineblutabnahme einmalig eine zusätzliche Blutprobe entnommen und im Anschluss die notwendige Laboruntersuchung durchgeführt werden. Eine weitere Blutabnahme, ein verlängerte oder veränderte Behandlung bzw. Betreuung bei uns sowie eine Medikamenteneinnahme sind damit *nicht* verbunden. Ein Risiko bei der Entnahme der zusätzlichen Blutprobe besteht nicht.

Ein Nutzen dieser Untersuchung für Sie persönlich ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht absehbar. Es könnte aber sein, dass die Studie hilft, herauszufinden, ob es Menschen gibt, die besonders empfindlich auf eine Interferontherapie reagieren und somit von einer individuelleren Betreuung und einem gezielten Nebenwirkungsmanagement während der Therapie profitieren könnten.

Die erhobenen Untersuchungsergebnisse und alle mit Ihnen und Ihrer Krankheit zusammenhängenden Informationen unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und dem Datenschutz und werden absolut vertraulich behandelt. Die Untersuchungsergebnisse werden ausschließlich anonymisiert zu wissenschaftlichen Zwecken ausgewertet und weiterverwendet. Klinikmitarbeiter, die nicht direkt an der Auswertung der Untersuchungsergebnisse beteiligt sind, erhalten keinen Einblick in die Patientenunterlagen.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können daher Ihr Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne dabei Nachteile für Ihre weitere medizinische Versorgung in Kauf zu nehmen zurückziehen. Das Ergebnis der Untersuchungen beeinflusst die für Sie notwendige medizinische Behandlung in keiner Weise. Falls Sie Ihr Einverständnis zurückziehen, wird bereits abgenommenes Blut vernichtet, es sei denn, Sie stimmen einer Auswertung zu.

Herzlichen Dank für Ihre Mitarbeit !

7.3 Einwilligungserklärung

Titel der Untersuchung:

Bedeutung eines spezifischen Genpolymorphismus (*IL28B*) für die Verträglichkeit einer Interferontherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion

Über Wesen, Bedeutung und Tragweite der vorliegenden klinischen Untersuchung bin ich eingehend unterrichtet worden. Ich habe einen Patienten-Aufklärungsbogen erhalten und durchgelesen. Außerdem bin ich zusätzlich mündlich aufgeklärt worden und konnte bei diesem Gespräch alle mich interessierenden Fragen im Zusammenhang mit der Untersuchung besprechen.

Risiken bei dieser Untersuchung bestehen nicht. Die mir erteilten Informationen habe ich inhaltlich voll verstanden.

Ich bin aus freiem Willen damit einverstanden, an dieser Untersuchung teilzunehmen. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne daraus resultierende Nachteile widerrufen kann.

Ich bin mit der im Rahmen der klinischen Prüfung erfolgten Aufzeichnung von Daten zu meiner Person (Alter, Geschlecht, Therapieverlauf) einverstanden. Die Daten werden im Rahmen des Datenschutzes absolut vertraulich behandelt und Dritten unter keinen Umständen zur Verfügung gestellt.

Datum

Unterschrift d. aufklärenden Arztes/Ärztin

Unterschrift Patient/in

7.4 Literaturverzeichnis

1. Keyvani H, Fazlalipour M, Monavari SH, Mollaie HR: Hepatitis C virus--proteins, diagnosis, treatment and new approaches for vaccine development. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2012, 13(12):5931-5949.
2. Hoofnagle JH: Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2002, 36(5 Suppl 1):S21-29.
3. Berg T: Chronische Hepatitis C – Therapeutische Strategien, molekulare Resistenzmechanismen und Relevanz neuer Hepatitis-assoziiierter Viren. Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin; 2002.
4. Palitzsch KD, Hottentrager B, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Scholmerich J, Jilg W: Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *European journal of gastroenterology & hepatology* 1999, 11(11):1215-1220.
5. Schreier E, Roggendorf M, Driesel G, Hohne M, Viazov S: Genotypes of hepatitis C virus isolates from different parts of the world. *Archives of virology Supplementum* 1996, 11:185-193.
6. Ross RS, Viazov S, Renzing-Kohler K, Roggendorf M: Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *Journal of medical virology* 2000, 60(2):122-125.
7. Lavanchy D: The global burden of hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2009, 29 Suppl 1:74-81.

8. Yen T, Keeffe EB, Ahmed A: The epidemiology of hepatitis C virus infection. *Journal of clinical gastroenterology* 2003, 36(1):47-53.
9. Jafri W, Subhan A: Hepatitis C in Pakistan: magnitude, genotype, disease characteristics and therapeutic response. *Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation* 2008, 29(4):194-201.
10. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Jr., Yawn DH, McAllister HA, Jr., Reitz BA, Nelson KE: The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 1992, 327(6):369-373.
11. KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney international Supplement* 2008(109):S1-99.
12. Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, Keles H: Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Renal failure* 2006, 28(8):729-735.
13. Alter MJ: Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1997, 26(3 Suppl 1):62s-65s.
14. Polywka S, Laufs R: Die vertikale Übertragung des Hepatitis-C-Virus von infizierten Müttern auf ihre Kinder Das Risiko der HCV-Übertragung durch Muttermilch ist gering. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 1999, 42(7):562-568.
15. Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH *et al*: [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection]. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2010, 48(2):289-351.

16. Centers for Disease Control and Prevention: Hepatitis C Questions and Answers for Health Professionals 2008; <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm>
17. Hoofnagle JH: Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* (Baltimore, Md) 1997, 26(3 Suppl 1):15s-20s.
18. Di Bisceglie AM: Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2000, 31(4):1014-1018.
19. Lauer GM, Walker BD: Hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 2001, 345(1):41-52.
20. Liang TJ, Heller T: Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004, 127(5 Suppl 1):S62-71.
21. Aleman S, Rahbin N, Weiland O, Davidsdottir L, Hedenstierna M, Rose N, Verbaan H, Stal P, Carlsson T, Norrgren H *et al*: A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C-associated liver cirrhosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013, 57(2):230-236.
22. 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* 2006, 45(4):529-538.
23. Amin J, Law MG, Bartlett M, Kaldor JM, Dore GJ: Causes of death after diagnosis of hepatitis B or hepatitis C infection: a large community-based linkage study. *Lancet* (London, England) 2006, 368(9539):938-945.
24. Neal KR: Excess mortality rates in a cohort of patients infected with the hepatitis C virus: a prospective study. *Gut* 2007, 56(8):1098-1104.

25. Marcellin P, Pequignot F, Delarocque-Astagneau E, Zarski JP, Ganne N, Hillon P, Antona D, Bovet M, Mechain M, Asselah T *et al*: Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption. *Journal of hepatology* 2008, 48(2):200-207.
26. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC: Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1998, 27(1):209-212.
27. Cordoba J, Flavia M, Jacas C, Sauleda S, Esteban JI, Vargas V, Esteban R, Guardia J: Quality of life and cognitive function in hepatitis C at different stages of liver disease. *Journal of hepatology* 2003, 39(2):231-238.
28. Forton DM, Taylor-Robinson SD, Thomas HC: Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection. *Journal of viral hepatitis* 2003, 10(2):81-86.
29. Carta MG, Hardoy MC, Garofalo A, Pisano E, Nonnoi V, Intilla G, Serra G, Balestrieri C, Chessa L, Cauli C *et al*: Association of chronic hepatitis C with major depressive disorders: irrespective of interferon-alpha therapy. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health : CP & EMH* 2007, 3:22.
30. Perry W, Hilsabeck RC, Hassanein TI: Cognitive dysfunction in chronic hepatitis C: a review. *Digestive diseases and sciences* 2008, 53(2):307-321.
31. Acharya JN, Pacheco VH: Neurologic complications of hepatitis C. *The neurologist* 2008, 14(3):151-156.
32. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 2016, 3(1):3-14.

33. Mayo MJ: Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *The American journal of the medical sciences* 2003, 325(3):135-148.
34. Ramos-Casals M, Font J: Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Current opinion in rheumatology* 2005, 17(4):447-455.
35. Sene D, Limal N, Cacoub P: Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metabolic brain disease* 2004, 19(3-4):357-381.
36. Fleig WE, Krummenerl P, Leßke J: Indikationsstellung Akute/Chronische Hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2004; 42(8): 707-713
37. Heathcote J, Main J: Treatment of hepatitis C. *Journal of viral hepatitis* 2005, 12(3):223-235.
38. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA: Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 1986, 315(25):1575-1578.
39. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Jr., Perrillo RP, Carey W, Jacobson IM, Payne J, Dienstag JL: Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *The New England journal of medicine* 1989, 321(22):1501-1506.
40. Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH: Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The New England journal of medicine* 1989, 321(22):1506-1510.
41. Lin R, Roach E, Zimmerman M, Strasser S, Farrell GC: Interferon alfa-2b for chronic hepatitis C: effects of dose increment and duration of treatment on response

rates. Results of the first multicentre Australian trial. Australia Hepatitis C Study Group. *Journal of hepatology* 1995, 23(5):487-496.

42. Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trepo C, Couzigou P, Payen JL, Sajus M, Costa JM: A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *The New England journal of medicine* 1995, 332(22):1457-1462.

43. Reichard O, Norkrans G, Fryden A, Braconier JH, Sonnerborg A, Weiland O: Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alfa-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish Study Group. *Lancet (London, England)* 1998, 351(9096):83-87.

44. Brok J, Gluud LL, Gluud C: Ribavirin plus interferon versus interferon for chronic hepatitis C. *The Cochrane database of systematic reviews* 2010(1):Cd005445.

45. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine* 1998, 339(21):1485-1492.

46. Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trepo C, Couzigou P, Payen JL, Sajus M, Costa JM: A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *The New England journal of medicine* 1995, 332(22):1457-1462.

47. Thuluvath PJ, Maheshwari A, Mehdi J, Fairbanks KD, Wu LL, Gelrud LG, Ryan MJ, Anania FA, Lobis IF, Black M: Randomised, double blind, placebo controlled trial of interferon, ribavirin, and amantadine versus interferon, ribavirin, and placebo in treatment naïve patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2004, 53(1):130-135.

48. Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, Berg T, Raedle J, Hartmann S, Hopf U: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alfa2a with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2000, 32(4 Pt 1):835-841.
49. Teuber G, Berg T, Naumann U, Raedle J, Brinkmann S, Hopf U, Zeuzem S: Randomized, placebo-controlled, double-blind trial with interferon-alpha with and without amantadine sulphate in primary interferon-alpha nonresponders with chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis* 2001, 8(4):276-283.
50. Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L: Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon nonresponsive chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2000, 32(3):630-634.
51. Adinolfi LE, Utili R, Tonziello A, Ruggiero G: Effects of alpha interferon induction plus ribavirin with or without amantadine in the treatment of interferon non-responsive chronic hepatitis C: a randomised trial. *Gut* 2003, 52(5):701-705.
52. Wills RJ: Clinical pharmacokinetics of interferons. *Clin Pharmacokinet* 1990, 19(5):390-399.
53. Nieforth KA, Nadeau R, Patel IH, Mould D: Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare in vivo activity of interferon alfa-2a and a polyethylene glycol-modified derivative in healthy subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1996, 59(6):636-646.
54. Xu ZX, Patel I, Joubert P. Single dose safety/tolerability and pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) following administration of ascending subcutaneous doses of pegylated interferon (PEG-IFN) and interferon alpha-2a (IFN alpha-2a) to healthy subjects. *Hepatology*. 1998;28:702.

55. Zeuzem S: Treatment Options in Hepatitis C: The Current State of the Art. *Dtsch Arztebl International* 2017, 114(1-2):11-21.
56. *Arzneimittel-Fachinformation (CH)*, 1995. 332:1457-62.
57. De Clercq E: Interferon and its inducers--a never-ending story: "old" and "new" data in a new perspective. *The Journal of infectious diseases* 2006, 194 Suppl 1:S19-26.
58. Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Ueda E, Maekawa S, Yamashiro T, Nakagawa M, Chen CH, Kanazawa N *et al*: Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *The Journal of infectious diseases* 2004, 189(7):1129-1139.
59. Meager A: *The interferons: Characterization and Application*. Wiley-Blackwell; 2006. 10.1002/3527608206
60. Holzer B: Interferon-beta bei Multipler Sklerose. vol. 18. *pharma-kritik*; 1996(1).
61. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP: IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology* 2003, 4(1):69-77.
62. Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1957, 147(927):258-267.
63. Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC: Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1957, 147(927):268-273.
64. Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC: Human interferons alpha, beta and omega. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 2004, 22(4):243-251.

65. Feld JJ, Hoofnagle JH: Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005, 436(7053):967-972.
66. Gale M, Jr.: Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2003, 37(5):975-978.
67. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A *et al*: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *The New England journal of medicine* 2000, 343(23):1666-1672.
68. Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A *et al*: Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *The New England journal of medicine* 2000, 343(23):1673-1680.
69. Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R *et al*: A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2001, 34(2):395-403.
70. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP, 3rd, Jensen D, Smith C *et al*: Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2001, 33(2):433-438.
71. 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* (London, England) 2001, 358(9286):958-965.
72. Fried MW: Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2002, 36(5 Suppl 1):S237-244.

73. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2002, 36(5 Suppl 1):S3-20.
74. Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH *et al*: [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2010, 48(2):289-351.
75. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, Ibranyi E, Weiland O, Noviello S, Brass C *et al*: Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *Journal of hepatology* 2006, 44(1):97-103.
76. Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M, Vinelli F, Scotto G, Bacca D, Annese M *et al*: Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *The New England journal of medicine* 2005, 352(25):2609-2617.
77. Licata A, Di Bona D, Schepis F, Shahied L, Craxi A, Camma C: When and how to treat acute hepatitis C? *Journal of hepatology* 2003, 39(6):1056-1062.
78. Zekry A, Patel K, McHutchison JG: Treatment of acute hepatitis C infection: more pieces of the puzzle? *Journal of hepatology* 2005, 42(3):293-296.
79. Kim AI, Saab S: Treatment of hepatitis C. *The American journal of medicine* 2005, 118(8):808-815.
80. Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J: Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md) 2003, 38(3):645-652.

81. Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG: Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis* 2001, 8(1):1-18.
82. Reichard O, Schvarcz R, Weiland O: Therapy of hepatitis C: alpha interferon and ribavirin. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1997, 26(3 Suppl 1):108s-111s.
83. Turner EH, Blackwell AD: 5-Hydroxytryptophan plus SSRIs for interferon-induced depression: synergistic mechanisms for normalizing synaptic serotonin. *Medical hypotheses* 2005, 65(1):138-144.
84. Debien C, De Chouly De Lenclave MB, Foutrein P, Bailly D: [Alpha-interferon and mental disorders]. *L'Encephale* 2001, 27(4):308-317.
85. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC: Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1998, 27(1):209-212.
86. Cordoba J, Flavia M, Jacas C, Sauleda S, Esteban JI, Vargas V, Esteban R, Guardia J: Quality of life and cognitive function in hepatitis C at different stages of liver disease. *Journal of hepatology* 2003, 39(2):231-238.
87. Forton DM, Taylor-Robinson SD, Thomas HC: Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection. *Journal of viral hepatitis* 2003, 10(2):81-86.
88. Carta MG, Hardoy MC, Garofalo A, Pisano E, Nonnoi V, Intilla G, Serra G, Balestrieri C, Chessa L, Cauli C *et al*: Association of chronic hepatitis C with major depressive disorders: irrespective of interferon-alpha therapy. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health : CP & EMH* 2007, 3:22.
89. Perry W, Hilsabeck RC, Hassanein TI: Cognitive dysfunction in chronic hepatitis C: a review. *Digestive diseases and sciences* 2008, 53(2):307-321.

90. Acharya JN, Pacheco VH: Neurologic complications of hepatitis C. *The neurologist* 2008, 14(3):151-156.
91. Raison CL, Broadwell SD, Borisov AS, Manatunga AK, Capuron L, Woolwine BJ, Jacobson IM, Nemeroff CB, Miller AH: Depressive symptoms and viral clearance in patients receiving interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C. *Brain, behavior, and immunity* 2005, 19(1):23-27.
92. Raison CL, Demetrashvili M, Capuron L, Miller AH: Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS drugs* 2005, 19(2):105-123.
93. Zdilar D, Franco-Bronson K, Buchler N, Locala JA, Younossi ZM: Hepatitis C, interferon alfa, and depression. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2000, 31(6):1207-1211.
94. Scalori A, Pozzi M, Bellia V, Apale P, Santamaria G, Bordoni T, Redaelli A, Avolio A, Parravicini P, Pioltelli P *et al*: Interferon-induced depression: prevalence and management. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2005, 37(2):102-107.
95. Kraus MR, Schafer A, Faller H, Csef H, Scheurlen M: Paroxetine for the treatment of interferon-alpha-induced depression in chronic hepatitis C. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2002, 16(6):1091-1099.
96. Gleason OC, Yates WR, Isbell MD, Philipsen MA: An open-label trial of citalopram for major depression in patients with hepatitis C. *The Journal of clinical psychiatry* 2002, 63(3):194-198.
97. Hauser P, Khosla J, Aurora H, Laurin J, Kling MA, Hill J, Gulati M, Thornton AJ, Schultz RL, Valentine AD *et al*: A prospective study of the incidence and open-label

treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C. *Molecular psychiatry* 2002, 7(9):942-947.

98. Schramm TM, Lawford BR, Macdonald GA, Cooksley WG: Sertraline treatment of interferon-alfa-induced depressive disorder. *The Medical journal of Australia* 2000, 173(7):359-361.

99. Trask PC, Esper P, Riba M, Redman B: Psychiatric side effects of interferon therapy: prevalence, proposed mechanisms, and future directions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000, 18(11):2316-2326.

100. Capuron L, Neurauter G, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Fuchs D, Miller AH: Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biological psychiatry* 2003, 54(9):906-914.

101. Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M: Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. *European journal of immunology* 2001, 31(8):2313-2318.

102. Wichers MC, Maes M: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 2004, 29(1):11-17.

103. Leonard BE: Changes in the immune system in depression and dementia: causal or co-incident effects? *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2001a, 19(3):305-312.

104. Leonard BE: The immune system, depression and the action of antidepressants. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2001b, 25(4):767-780.

105. Leonard BE, Song C: Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1996, 54(1):299-303.
106. Dentino AN, Pieper CF, Rao MK, Currie MS, Harris T, Blazer DG, Cohen HJ: Association of interleukin-6 and other biologic variables with depression in older people living in the community. *Journal of the American Geriatrics Society* 1999, 47(1):6-11.
107. Maes M: Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 1995, 19(1):11-38.
108. Maes M: Major depression and activation of the inflammatory response system. *Advances in experimental medicine and biology* 1999, 461:25-46.
109. Sluzewska A, Rybakowski J, Bosmans E, Sobieska M, Berghmans R, Maes M, Wiktorowicz K: Indicators of immune activation in major depression. *Psychiatry research* 1996, 64(3):161-167.
110. Song C, Lin A, Bonaccorso S, Heide C, Verkerk R, Kenis G, Bosmans E, Scharpe S, Whelan A, Cosyns P *et al*: The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression. *Journal of affective disorders* 1998, 49(3):211-219.
111. Wichers M, Maes M: The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *The international journal of neuropsychopharmacology* 2002, 5(4):375-388.
112. van West D, Maes M: Activation of the inflammatory response system: A new look at the etiopathogenesis of major depression. *Neuro endocrinology letters* 1999, 20(1-2):11-17.

113. Dantzer R: Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001, 933:222-234.
114. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmacher T: Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Archives of general psychiatry* 2001, 58(5):445-452.
115. Ho BT, Huo YY, Lu JG, Tansey LW, Levin VA: Opioid-dopaminergic mechanisms in the potentiation of d-amphetamine discrimination by interferon-alpha. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1992, 42(1):57-60.
116. Valentine AD, Meyers CA, Kling MA, Richelson E, Hauser P: Mood and cognitive side effects of interferon-alpha therapy. *Seminars in oncology* 1998, 25(1 Suppl 1):39-47.
117. Sachithanandan S, Clarke G, Crowe J, Fielding JF: Interferon-associated thyroid dysfunction in anti-D-related chronic hepatitis C. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 1997, 17(7):409-411.
118. Dalgard O, Bjoro K, Hellum K, Myrvang B, Bjoro T, Haug E, Bell H: Thyroid dysfunction during treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: no association with either interferon dosage or efficacy of therapy. *Journal of internal medicine* 2002, 251(5):400-406.
119. Vassilopoulou-Sellin R: Endocrine effects of cytokines. *Oncology (Williston Park, NY)* 1994, 8(10):43-46, 49; discussion 49-50.
120. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ *et al*: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009, 461(7262):399-401.

121. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, Shianna KV, Mottola L, Petruzzellis D, Bacca D *et al*: An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 2010, 139(3):821-827, 827.e821.
122. Engel A: Methoden der Statistik zur Analyse von Single Nucleotide Polymorphism (SNP) anhand der Auswertung von Genotypdaten aus einer neoadjuvanten Chemotherapiestudie. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2015.
123. Stoszek SK, Abdel-Hamid M, Narooz S, El Daly M, Saleh DA, Mikhail N, Kassem E, Hawash Y, El Kafrawy S, Said A *et al*: Prevalence of and risk factors for hepatitis C in rural pregnant Egyptian women. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006, 100(2):102-107.
124. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E *et al*: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature genetics* 2009, 41(10):1100-1104.
125. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S *et al*: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature genetics* 2009, 41(10):1105-1109.
126. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG: IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *The American journal of gastroenterology* 2011, 106(1):38-45.
127. Chevaliez S, Hezode C: IL28B polymorphisms and chronic hepatitis C. *Gastroenterologie clinique et biologique* 2010, 34(11):587-589.

128. Zimmermann P, Fimm B: Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung (TAP) – Test for Attentional Performance. Version 1.02c. Psytest, Herzogenrath. 1994.
129. Zimmerman P, Fimm B: A test battery for attentional performance; 1. publ. In: Applied neuropsychology of attention: theory, diagnosis and rehabilitation / ed by Michel Leclercq London: Psychology Press; 2002: 110-151.
130. Herrmann C, Buss U, Snaith RP. HADS-D Hospital Anxiety and Depression Scale – Deutsche Version. Ein Fragebogen zur Erfassung von Angst und Depressivität in der somatischen Medizin. Testdokumentation und Handanweisung. (1. Aufl.). Bern: Huber, 1995.
131. Herrmann C: International experiences with the Hospital Anxiety and Depression Scale--a review of validation data and clinical results. Journal of psychosomatic research 1997, 42(1):17-41.
132. Kraus MR, Schäfer A, Csef H, Scheurlen M: Psychiatric side effects of pegylated interferon alfa-2b as compared to conventional interferon alfa-2b in patients with chronic hepatitis C. World Journal of Gastroenterology : WJG 2005, 11(12):1769-1774.
133. Stern C: THE HARDY-WEINBERG LAW. Science 1943, 97(2510):137.
134. Lyons J: The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. Cancer 1992, 69(S6):1527-1531.
135. Müller HJ: PCR - Polymerase-Kettenreaktion: Spektrum Akademischer Verlag; 2001.
136. Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positives with PCR. Nature 1989, 339(6221):237-238.

137. Heinrich, M.: PCR carry-over. *Biotech Forum Europe* 1991, 8:594–597.
138. Bente D: Evaluierung konventioneller und real-time RT-PCR-Protokolle für die spezifische Diagnose des Virus der Klassischen Schweinepest. *Tierärztliche Hochschule Hannover*; 2003.
139. Hill PJ, Stewart GSAB: The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Microbiology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1992, 10(1):343-378.
140. Mühlhardt C: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg ; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
141. Lin CY, Chen JY, Lin TN, Jeng WJ, Huang CH, Huang CW, Chang SW, Sheen IS: IL28B SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection. *PloS one* 2011, 6(3):e18322.
142. Fried MW: Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2002, 36(5 Suppl 1):S237-244.
143. Janssen HL, Brouwer JT, van der Mast RC, Schalm SW: Suicide associated with alfa-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Journal of hepatology* 1994, 21(2):241-243.
144. Lotrich FE, Ferrell RE, Rabinovitz M, Pollock BG: Risk for depression during interferon-alpha treatment is affected by the serotonin transporter polymorphism. *Biological psychiatry* 2009, 65(4):344-348.
145. Yoshida K, Alagbe O, Wang X, Woolwine B, Thornbury M, Raison CL, Miller AH: Promoter Polymorphisms of the Interferon- α Receptor Gene and Development of Interferon-Induced Depressive Symptoms in Patients with Chronic Hepatitis C: Preliminary Findings. *Neuropsychobiology* 2005, 52(2):55-61.

146. Su KP, Huang SY, Peng CY, Lai HC, Huang CL, Chen YC, Aitchison KJ, Pariante CM: Phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 genes influence the risk of interferon-alpha-induced depression by regulating polyunsaturated fatty acids levels. *Biological psychiatry* 2010, 67(6):550-557.
147. Kraus MR, Al-Taie O, Schäfer A, Pfersdorff M, Lesch KP, Scheurlen M: Serotonin-1A Receptor Gene HTR1A Variation Predicts Interferon-Induced Depression in Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 2007, 132(4):1279-1286.
148. Lotrich FE, Loftis JM, Ferrell RE, Rabinovitz M, Hauser P: IL28B Polymorphism Is Associated with Both Side Effects and Clearance of Hepatitis C During Interferon-Alpha Therapy. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2011, 31(3):331-336.
149. Lotrich FE, Ferrell RE, Rabinovitz M, Pollock BG: Labile anger during interferon-alpha treatment is associated with a polymorphism in tumor necrosis factor-alpha. *Clinical neuropharmacology* 2010, 33(4):191-197.
150. Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Tanaka E: Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2008, 48(6):1753-1760.
151. Bull SJ, Huezo-Diaz P, Binder EB, Cubells JF, Ranjith G, Maddock C, Miyazaki C, Alexander N, Hotopf M, Cleare AJ *et al*: Functional polymorphisms in the interleukin-6 and serotonin transporter genes, and depression and fatigue induced by interferon-alpha and ribavirin treatment. *Molecular psychiatry* 2009, 14(12):1095-1104.
152. Raison CL, Broadwell SD, Borisov AS, Manatunga AK, Capuron L, Woolwine BJ, Jacobson IM, Nemeroff CB, Miller AH: Depressive symptoms and viral clearance in patients receiving interferon- α and ribavirin for hepatitis C. *Brain, behavior, and immunity* 2005, 19(1):23-27.

153. Maddock C, Landau S, Barry K, Maulayah P, Hotopf M, Cleare AJ, Norris S, Pariante CM: Psychopathological symptoms during interferon-alpha and ribavirin treatment: effects on virologic response. *Molecular psychiatry* 2005, 10(4):332-333.
154. Fontana RJ, Kronfol Z, Lindsay KL, Bieliauskas LA, Padmanabhan L, Back-Madruga C, Lok AS, Stoddard AM: Changes in mood states and biomarkers during peginterferon and ribavirin treatment of chronic hepatitis C. *The American journal of gastroenterology* 2008, 103(11):2766-2775.
155. Loftis JM, Socherman RE, Howell CD, Whitehead AJ, Hill JA, Dominitz JA, Hauser P: Association of interferon-alpha-induced depression and improved treatment response in patients with hepatitis C. *Neuroscience letters* 2004, 365(2):87-91.
156. Castera L, Constant A, Henry C, Champbenoit P, Bernard PH, De Ledinghen V, Demotes-Mainard J, Couzigou P: Impact on adherence and sustained virological response of psychiatric side effects during peginterferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006, 24(8):1223-1230.
157. Dollarhide AW, Loh C, Leckband SG, Endow-Eyer R, Robinson S, Meyer JM: Psychiatric comorbidity does not predict interferon treatment completion rates in hepatitis C seropositive veterans. *Journal of clinical gastroenterology* 2007, 41(3):322-328.
158. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Sola R, Shafran SD, Barange K, Lin A, Soman A et al: Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *The New England journal of medicine* 2007, 357(2):124-134.
159. Vrbanac DB, Buljan D, Sindik I, Gelo J, Sakoman LN: Psychiatric aspects of hepatitis C treatment. *Acta clinica Croatica* 2013, 52(3):346-352.

7.5 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung Nr. 1: Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte nach Amplifizierung mittels klassischer PCR nach Sanger (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%)	<u>35</u>
Abbildung Nr. 2: Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte nach Amplifizierung mittels klassischer PCR nach Sanger (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%)	<u>36</u>
Abbildung Nr. 3: Darstellung der FailSafeKIT-PCR-Produkte (Primer rs 12979860neu) mittels Agarosegelelektrophore (1,5%)	<u>38</u>
Abbildung Nr. 4: Darstellung der FailSafeKIT-PCR-Produkte (Primer IL28Bneu) mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%)	<u>39</u>
Abbildung Nr. 5: Darstellung der FailSafeKIT-PCR-Produkte (Primer HPSF, Puffer J) mittels Agarosegelelektrophore (1,5%): exemplarische Darstellung (Patient 1-16) für das gesamte Patientenkollektiv	<u>40</u>
Abbildung Nr. 6: Darstellung der FailSafeKIT-PCR-Produkte (Primer IL28Bneu, Puffer G) mittels Agarosegelelektrophore (1,5%): exemplarische Darstellung (Patient 69-88) für das gesamte Patientenkollektiv	<u>41</u>
Abbildung Nr. 7: Exemplarische Darstellung (Pseudogelelektrophorese) eines Auszuges des sequenzierten DNA-Abschnittes von zwei willkürlich ausgewählten Studienteilnehmern (Patient 1, 7)	<u>42</u>
Abbildung Nr. 8: Exemplarische Darstellung (Kurvendiagramm) eines Auszuges des sequenzierten DNA-Abschnittes von drei willkürlich ausgewählten Studienteilnehmern (Patient 1, 7, 8)	<u>43</u>
Abbildung Nr. 9: Elektronische Darstellungsform, Ausschnitt des DNA-Abschnittes im Bereich von IL28B auf Chromosom 19	<u>44</u>
Abbildung Nr. 10: Elektronische Darstellungsform, Ausschnitt des DNA-Abschnittes im Bereich von IL28B auf Chromosom 19	<u>45</u>
Abbildung Nr. 11: Darstellung der Sustained Virological Response (SVR) Raten der drei Genotypvarianten des SNP rs 12979860 im Würzburger Patientenkollektiv	<u>48</u>

- Abbildung Nr. 12: Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die drei Genotypvarianten (C/C, C/T, T/T) des SNP rs 12979860 50
- Abbildung Nr. 13: Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die drei Genotypvarianten (C/C, C/G, G/G) des SNP rs 28416813 51
- Abbildung Nr. 14: Darstellung der Punkteveränderungen/Standardabweichungen/p-Werte in der Subskala „Depressivität“ im HADS für die zwei Genotypvarianten (AAG, AGG) des SNP rs 8103142 52
- Abbildung Nr. 15: Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die drei Genotypvarianten (C/C, C/T, T/T) des SNP rs 12979860 54
- Abbildung Nr. 16: Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die drei Genotypvarianten (C/C, C/G, G/G) des SNP rs 28416813 55
- Abbildung Nr. 17: Darstellung der Reaktionszeitdifferenz/Standardabweichungen/p-Werte in den TAP-Subtests „Alertness“ und „Vigilanz“ für die zwei Genotypvarianten (AAG, AGG) des SNP rs 8103142 56
- Abbildung Nr. 18: Graphischer Vergleich der Genotypenverteilungen der Würzburger Studie und der Studie von Dongliang Ge et al 61
 Nach: Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ *et al*: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009, 461(7262):399-401.

7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr. 1: Beurteilung des virologischen Ansprechens unter Therapie:	
Tabellarische Auflistung der Definitionen	<u>5</u>
Nach: Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH <i>et al</i> : [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection]. Zeitschrift für Gastroenterologie 2010, 48(2):289-351.	
Tabelle Nr. 2: Tabellarische Darstellung der Inzidenz häufiger Nebenwirkungen einer antiviralen Kombinationstherapie bei Patientin mit chronischer Hepatitis-C-Infektion	<u>10</u>
Nach: Aspinall RJ, Pockros PJ. (2004): The management of side-effects during therapy for hepatitis, Aliment Pharmacol Ther. 2004 Nov 1; 20(9):917-29.	
Tabelle Nr. 3: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien	<u>19</u>
Tabelle Nr. 4: Tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte	<u>23</u>
Tabelle Nr. 5: Tabellarische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	<u>24</u>
Tabelle Nr. 6: Tabellarische Auflistung der verwendeten Chemikalien	<u>24</u>
Tabelle Nr. 7: Tabellarische Auflistung der verwendeten Kits	<u>25</u>
Tabelle Nr. 8: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer	<u>26</u>
Tabelle Nr. 9: Tabellarische Auflistung der verwendeten Standardlösungen	<u>26</u>
Tabelle Nr. 10: PCR-Reaktionsansatz, Teil 1	<u>29</u>
Tabelle Nr. 11: PCR-Reaktionsansatz, Teil 2	<u>29</u>
Tabelle Nr. 12: Standard PCR Bedingungen	<u>30</u>
Tabelle Nr. 13: Standard PCR Bedingungen für IL 28neu	<u>30</u>
Tabelle Nr. 14: Standard PCR Bedingungen für rs 12979860neu	<u>31</u>
Tabelle Nr. 15: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 28416813	<u>46</u>
Tabelle Nr. 16: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 8103142	<u>47</u>

Tabelle Nr. 17: Tabellarische Darstellung der Genotypenverteilung des Genpolymorphismus rs 12979860	<u>47</u>
Tabelle Nr. 18: Tabellarischer Vergleich der Genotypenverteilungen der Würzburger Studie und der Studie von Dongliang Ge et al	<u>61</u>
Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ <i>et al</i> : Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009, 461(7262):399-401.	

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung anderer so nicht möglich gewesen. Zuerst möchte ich deshalb Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher für die Möglichkeit danken, an der Universitätsklinik Würzburg promovieren zu dürfen. Nach seinem Themenvorschlag für die vorliegende Doktorarbeit gab er mir gemeinsam mit seinem gesamten Laborteam über die vergangenen Jahre die Möglichkeit mich sowohl praktisch als auch theoretisch in das Themengebiet einzuarbeiten. Mein herzlicher Dank gilt vor allem auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Arne Schäfer für die sehr gute Betreuung sowie Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, seine umfassende Unterstützung bei der Klärung von inhaltlichen Problemen und seine Hilfe bei der Postererstellung zur Vorstellung meines Dissertationsthemas im Rahmen der 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern (Bamberg 2013). Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. D. Rogoll, der mich betreuenden MTA Kerstin Backhaus sowie dem gesamten Team des Gastroenterologischen Labors der Universitätsklinik Würzburg unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher, welches mich geduldig in die Experimentelle Forschung eingearbeitet hat und mir jederzeit für die fachlich kompetente Lösung auftretender Probleme zur Seite stand. Das gesamte Mitarbeiterteam mit seinen jahrelangen Erfahrungen stand mir mit Rat und Tat bei Seite und hatte dadurch wesentlichen Anteil am Gelingen meiner laborchemischen Arbeiten. Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Gastroenterologie bzw. Infektions/Leberambulanz für die gute Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich allen teilnehmenden Probanden danken, welche sich im Dienste der Wissenschaft bereit erklärt haben, für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung zu stehen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Partnerin sowie meiner Familie bedanken, die mir auch in schwierigen Momenten nach frustrierten Versuchen im Labor zur Seite standen und mich stets motivierten neben dem Klinikalltag die Dissertation mit der schriftlichen Fassung abzuschließen. Vielen Dank für die kontinuierliche und jahrelange Unterstützung!

