

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des Ferroportins bei chronischer Hepatitis C

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tonio Ellermeyer
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Schmidt
2. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann
3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Wedemeyer

Datum der Promotion: 20.11.2009

Für meine Eltern

Aus Prioritätsgründen wurden Auszüge dieser Arbeit bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Als “Presidential Poster of Distinction” mit dem Titel „Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) as potential predictor for the treatment response in hepatitis C” anlässlich der 59sten Jahrestagung der AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases), vom 31. Oktober bis 4. November 2008, San Francisco, Ca, USA.

T Ellermeyer, J Büttner, S Kaiser, H G Hass, E Gentz, T Fiedler, B Bochow, R Weltrich, H Lochs, H Schmidt. Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) as potential predictor for the treatment response in hepatitis C. Hepatology 2008;48(S1):1096A

1 Einleitung	1
1.1 Die chronische Hepatitis C (CHC)	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Erstbeschreibungen	1
1.1.3 Erreger	1
1.1.4 Infektionsweg	2
1.1.5 Pathophysiologie	2
1.1.6 Manifestationen	3
1.1.7 Verlaufsformen	5
1.1.8 Epidemiologie	5
1.1.9 Diagnostik	6
1.1.10 Therapie	7
1.1.11 Prädiktoren	10
1.2 CHC und Eisen	12
1.2.1 CHC-Verlauf und hepatischer Eisenüberschuss	12
1.2.2 Phlebotomie und CHC-Therapieerfolg	13
1.2.3 Mechanismus der Eisenüberladung bei CHC	13
1.3 Ferroportin	14
1.3.1 Erstbeschreibungen	14
1.3.2 Gen und Protein	14
1.3.3 Funktion	14
1.3.4 Steuerung des Eisenexports	15
1.3.5 Transportertyp	17
1.3.6 Synonyme und Abkürzungen	17
1.3.7 Hämochromatose Typ IV	17
2 Aufgabenstellung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Probanden-Rekrutierung	20
3.1.1 Berliner Kontrollen	20
3.1.2 Berliner Patienten	20
3.1.3 Tübinger Patienten	20
3.2 Ethikvotum	21
3.3 Material	21
3.3.1 Blutproben	21
3.3.2 Geräte	22
3.3.3 Chemikalien	22
3.3.4 Software	23
3.4 Experimentelle Methoden	23
3.4.1 DNA-Isolierung	23
3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese	29
3.4.4 Aufreinigung des PCR-Produktes	30
3.4.5 Kettenabbruch mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs	32
3.4.6 Aufreinigung des Kettenabbruch-Produktes	35
3.4.7 Denaturierung des Kettenabbruch-Produktes	36
3.4.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)	36
3.4.9 Einbau künstlicher Restriktionsschnittstellen	38
3.5 Statistische Methoden	39

4 Ergebnisse	40
4.1 Sequenzanalyse	40
4.2 Haplotypenanalyse	47
4.3 Polymorphismenscreening	50
4.4 Statistische Auswertung	51
4.4.1 Auswahl der Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg	52
4.4.2 Fallzahlen	52
4.4.3 Entscheidung über statistisches Testen	53
4.4.4 Statistische Testung	57
4.4.5 Zusammenfassung dieser Analyse	71
5 Diskussion	72
6 Zusammenfassung	84
7 Literaturverzeichnis	85
8 Abkürzungsverzeichnis	96
9 Anhang	99
9.1 Danksagung	99
9.2 Lebenslauf	100
9.3 Publikationsliste	101
9.4 Selbständigkeitserklärung	102

1 Einleitung

1.1 Die chronische Hepatitis C (CHC)

1.1.1 Definition

Eine Hepatitis C ist eine nekroinflammatorische Leberentzündung – verursacht durch das Hepatitis-C-Virus (HCV). Sie wird als chronisch bezeichnet, wenn sich auch sechs Monate nach der Infektion noch Virus-RNA im Serum nachweisen lässt (1).

1.1.2 Erstbeschreibungen

Erstmals beschrieben wurde die Hepatitis C Mitte der 1970er als Non-A-Non-B-Hepatitis (2-5). Das Hepatitis-C-Virus selbst wurde erst 1989 identifiziert (6, 7).

1.1.3 Erreger

Das Hepatitis-C-Virus ist ein Mitglied der Familie der Flaviviren vom Genus Hepacivirus (8, 9). Es hat ein einsträngiges, positives RNA-Genom, das eine Vielzahl von Varianten aufweist (10). Diese genomische Diversität ist darauf zurückzuführen, dass die Replikation mittels RNA-Polymerase gar keine, fehlerhafte oder nur schwache Fehler-Korrektur-Mechanismen besitzt (10-12). In der gegenwärtig gültigen Nomenklatur werden sechs Genotypen und eine große Anzahl von Subtypen unterschieden (8). Die unterschiedlichen Subtypen sind in unterschiedlichen Regionen verschieden stark vertreten, wobei weltweit Regionen mit hoher HCV-Genom-Diversität von Regionen mit geringer Diversität unterschieden werden (11). Es wird angenommen, dass das Virus in Regionen mit hoher Diversität bereits wesentlich länger existiert als in Regionen mit geringer Diversität (10). Afrika, China und Südostasien gelten als Regionen hoher Diversität, westliche und nicht-tropische Länder als Regionen geringer Diversität. Die Subtypen 1a, 1b und 2a-c werden in westlichen Ländern am häufigsten diagnostiziert und sind somit die Subtypen, über deren klinische Manifestation die umfangreichste Dokumentation vorliegt. Ihr Anteil an der Zahl aller weltweit beschriebenen Subtypen ist jedoch geringfügig (8).

Einzigster natürlicher Wirt des Hepatitis-C-Virus ist der Mensch (9).

Der Begriff der Quasispezies beschreibt das Vorliegen verschiedener Varianten des HCV-Genoms bei einem einzelnen infizierten Patienten (10).

1.1.4 Infektionsweg

Hepatitis-C-Infektionsmodi werden als bekannt oder unbekannt, belegt oder vermutet beschrieben; der Anteil der Infektionen mit unbekanntem Infektionsmodus wird mit 20-50 % angegeben (13, 14).

Die Übertragungswege werden nach ihrer Effizienz im Einzelfall und nach ihrem Anteil an allen erfolgten Übertragungen unterteilt.

Effizientere Übertragungswege sind großvolumige oder wiederholte, direkte, perkutane Kontakte mit Blut; weniger effizient sind einzelne, kleinvolumige, perkutane Blutkontakte sowie Expositionen von Mukosa zu Blut oder zu aus Serum entstammenden Flüssigkeiten (15).

Beispiele für effizientere Transmissionsmodi sind Transfusionen und Transplantationen infizierten Spendermaterials sowie intravenöser Drogenabusus unter Verwendung infizierten Injektionsmaterials (15). Beispiele für weniger effiziente Übertragungswege sind Nadelstichverletzungen, Geburt von infizierter Mutter und Sex mit infiziertem Partner (15-18).

Beim Anteil der Übertragungsmodi an der Gesamtheit der stattgefundenen Übertragungen muss zwischen Entwicklungsländern und so genannten Erste-Welt-Ländern unterschieden werden: Die dominierenden Infektionswege in Entwicklungsländern sind unsichere therapeutische Injektionen und Transfusionen mit infizierten Blutprodukten. In so genannten Erste-Welt-Ländern sind intravenöse Drogeninjektion mittels infiziertem Material sowie Sex mit infiziertem Partner die Hauptursachen für Neuinfektionen; Infektionen durch Bluttransfusionen vor der Zeit systematischen HCV-Screenings stellen auch in den Erste-Welt-Ländern einen Großteil der insgesamt vorliegenden Infektionen dar (19).

Der mit 20-50 % beachtliche Anteil der Infektionen mit unklarem Übertragungsmodus (13, 14) kann folgendermaßen erklärt werden: Das Hepatitis-C-Virus kann im Plasma ex vivo bei Raumtemperatur für zumindest 16 Stunden überleben (20); es existiert damit eine Vielzahl biologisch plausibler Übertragungswege. Für das Gros dieser Übertragungswege existieren nicht ausreichend Daten, um zu beurteilen, ob und inwieweit sie an der HCV-Übertragung teilhaben. Beispiele für hypothetisierte aber nicht belegte Infektionsmodi sind Tätowierungen, Body-Piercing, nasale Medikamenteneinnahme, rituelle Narben, Beschneidungen, Akupunktur und Schröpfen (19).

1.1.5 Pathophysiologie

Der genaue molekulare Pathomechanismus der Organschädigung durch das HC-Virus ist unklar (21). Im Rahmen einer chronischen Hepatitis C scheint das Hepatitis-C-Virus selbst nicht direkt zytotoxisch zu sein (22, 23). Die Zellzerstörung wird wahrscheinlich durch lokal unterhaltene,

hauptsächlich unspezifische Immunantworten bewirkt (23), die ausreichend stark sind, um eine Zellschädigung zu bewirken, aber zu schwach sind, um das Virus zu eradizieren (22). Die Ursache für die unzureichende Stärke der Immunantwort scheint in der Fähigkeit des HC-Virus zu liegen, das Profil der von T-Zellen sezernierten Zytokine zu verändern und eine Resistenz gegenüber den Effekten antiviraler Zytokine zu bewirken (wie z. B. Interferon) (24). Die zur Viruseradikation unzureichenden Entzündungsreaktionen triggern die Fibrogenese, die bis zur Zirrhose führen kann. Das Vorliegen einer Zirrhose erhöht wiederum das Risiko für die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms. Die Rolle der HCV-Proteine in der Genese des Hepatozellulären Karzinoms ist ungeklärt (23).

1.1.6 Manifestationen

Eine chronische HCV-Infektion kann zur Entstehung von Leberfibrose, Leberzirrhose und Hepatozellulärem Karzinom führen (22, 25). Zu dieser Entwicklung scheint es jedoch nur bei einer Minderheit der chronisch Infizierten zu kommen (26-33). Bei der Mehrheit wird vor allem eine Einschränkung der gesundheitsbedingten Lebensqualität beschrieben, die auf eine Vielzahl von Beschwerden zurückgeführt wird; in der einzigen bisher publizierten Studie zum Spektrum der klinischen Manifestationen der CHC (25) wurden in vier Gruppen eingeteilt folgende, Lebensqualität einschränkende Symptome beschrieben (siehe Tab. 1):

Tab. 1: Lebensqualität einschränkende Symptome

Symptom-Gruppe	Lebensqualität einschränkende Symptome
Neuropsychiatrische Symptome	mentale und physische Müdigkeit, Konzentrationschwäche, Vergesslichkeit, Depression, Reizbarkeit, Schlafstörungen
Gastrointestinale Symptome	Schwitzen, Übelkeit, Lebensmittelunverträglichkeiten, Appetitlosigkeit, Durchfall, abdominelle Schmerzen
Algesie	Arthralgie, Myalgie, Ganzkörperschmerz
Dysästhesie	Geräuschempfindlichkeit, Lichtempfindlichkeit, dermatologische Probleme, Kopfschmerzen

Die Symptome mit der höchsten Prävalenz seien physische Müdigkeit, Reizbarkeit, Depression, mentale Müdigkeit und abdomineller Schmerz respektive. Die Beschwerden würden als moderat bis schwer ausgeprägt berichtet; völlige Beschwerdefreiheit sei selten (25). Ob, wie und

inwieweit diese Symptome pathophysiologisch auf die HCV-Infektion zurückzuführen sind, ist nicht geklärt (22, 25).

Neben den klinischen Manifestationen von Leberfibrose, -zirrhose und Hepatozellulärem Karzinom sowie den soeben beschriebenen Lebensqualität beeinträchtigenden Symptomen sind noch die so genannten extrahepatischen Manifestationen zu nennen: Hierbei handelt es sich um all die als extrahepatisch beschriebenen Krankheitsbilder, Syndrome oder Symptome, die seit Erstbeschreibung des HC-Virus mit chronischen HCV-Infektionen assoziiert wurden. Die Grade der Assoziation sind strittig, die Prävalenzen unklar und pathophysiologische Verbindungen zum HC-Virus bislang nicht ausreichend bekannt (34-38). In der jüngsten, ebenfalls strittigen Einteilung nach Stärke der Assoziation zur chronischen HCV-Infektion (35) werden folgende extrahepatische Manifestationen aufgeführt (siehe Tab. 2):

Tab. 2: Extrahepatische Manifestationen

Gewissheit der Assoziation zur CHC	Extrahepatische Manifestation
Hoch	Gemischte Kryoglobulinämie Nichtkryoglobulinämische systemische Vaskulitis Milz-Lymphom mit villösen Lymphozyten Müdigkeit Porphyria Cutanea Tarda Sicca Syndrom Autoantikörper-Produktion
Mild	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom Autoimmune Thrombozytopenie Juckreiz Diabetes mellitus Typ II
Fraglich	Autoimmun-Thyreoiditis Lichen Planus
Auf Einzelfallberichten basierend	Lungenfibrose Progressive Encephalomyelitis Ulcera der Kornea Erythema nodosum Chronische Polyradikuloneuritis

Bedeutung wird den extrahepatischen Manifestationen aus folgenden Gründen zugeschrieben: Sie können von Fall zu Fall die Erstmanifestation einer HCV-Infektion darstellen, ihr Schweregrad kann höher als der der hepatischen Manifestationen sein, ihr Vorhandensein kann

eine Modifizierung der HCV-Therapie erforderlich machen und von der Analyse ihrer pathomorphologischen Gemeinsamkeiten wird Einsicht in die pathophysiologischen Mechanismen des HC-Virus erhofft (36).

1.1.7 Verlaufsformen

Die Anteile einzelner Verlaufsformen an der Gesamtzahl der Infektionen sind nicht bekannt. Ihre Beschreibung würde die Beobachtung von Kollektiven ab dem Zeitpunkt der Infektion voraussetzen, was aus mehreren Gründen schwierig ist (39): Die akute Infektion ist häufig asymptomatisch (40, 41) - und ist sie symptomatisch, so schränken die Symptome häufig die Lebensqualität derart geringfügig ein und sind so unspezifisch, dass die Diagnose nicht gestellt wird (39). Um in einem Kollektiv potentiell Erkrankender die Infektionszeitpunkte zu bestimmen, müsste dieses Kollektiv also einem regelmäßigen Screening unterzogen werden (39). Und um alle derzeit bekannten Manifestationsformen zu erfassen, müsste dieses Screening mittels Leberbiopsie erfolgen, da andernfalls okkulte HCV-Infektionen nicht miterfasst würden: Diese sind dadurch definiert, dass HCV-RNA im Lebergewebe nachgewiesen wird, während im Serum weder anti-HCV-Antikörper noch HCV-RNA gefunden werden (42). Klinisch können okkulte HCV-Infektionen sowohl apparent (43, 44) als auch inapparent (42) verlaufen.

Prospektive Studien, in denen Kollektive potentiell Erkrankender in regelmäßigen Abständen einem Screening mittels Leberbiopsie unterzogen werden, existieren verständlicherweise nicht. Auch existieren bislang keine Studien, die infizierte Patienten über mehr als 25 Jahre mitverfolgt haben (39). Die folgenden, existierenden, quantitativen Aussagen zu den einzelnen Verlaufsformen sind also mit entsprechender Vorsicht zu betrachten:

Die akute Hepatitis-C-Infektion verläuft bei der Mehrheit der Infizierten symptomlos (40, 41); desgleichen chronifiziert sie bei der Mehrheit (26). 4-24 % der chronisch Infizierten entwickeln innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose (26), die bei 4 % pro Jahr dekompenziert (27, 28); ein Hepatozelluläres Karzinom entwickeln pro Jahr 1-7 % der HCV-Patienten, die eine Leberfibrose aufweisen (27-33).

1.1.8 Epidemiologie

Die geschätzte weltweite Prävalenz von HCV-Infektionen wird mit Werten zwischen 2,0 % (26) und 2,2 % (19, 45) angegeben. Dabei wird betont, dass es sich um Durchschnittswerte mit erheblichen regionalen Unterschieden handelt; die regional niedrigsten Prävalenzen wurden für Skandinavien und Großbritannien mit Werten von 0,01-0,1 % angegeben; die mit 15-20 % höchsten Prävalenzwerte stammen aus Ägypten. In den einzelnen Regionen werden des weiteren

unterschiedlich stark ausgeprägte Prävalenzunterschiede zwischen verschiedenen Alters- und Risikogruppen beobachtet (19).

Die Bestimmung der Inzidenz ist besonders schwierig, da die akute Infektion in der Mehrzahl der Fälle symptomlos verläuft und selbst die diagnostizierten Akutinfektionen in den meisten Ländern nicht systematisch erfasst werden. Verlässliche weltweite Daten existieren nicht (19).

1.1.9 Diagnostik

Die im Folgenden dargestellten diagnostischen Verfahren und Vorgehensweisen beziehen sich auf aktuelle Empfehlungen hepatologischer bzw. hepatogastroenterologischer Fachgesellschaften (1, 46-51).

Bei bestehendem Verdacht auf HCV-Infektion wird ein Test auf anti-HCV-Antikörper empfohlen, der – falls positiv - durch einen serologischen Nachweis von HCV-RNA bestätigt werden sollte. Ein negatives Ergebnis des anti-HCV-Antikörper-Tests erlaubt allerdings nicht den Ausschluss einer HCV-Infektion. Insbesondere bei ätiologisch unklarer Lebererkrankung immuninkompetenter Patienten bzw. bei Verdacht auf eine akute HCV-Infektion sollte auch auf ein negatives anti-HCV-Antikörper-Testergebnis ein HCV-RNA-Assay folgen (1, 49). Bei Verdacht auf eine okkulte HCV-Infektion stellt die Leberbiopsie die einzige Möglichkeit sowohl zur Diagnosestellung als auch zur Genotypisierung dar (42).

Vor Beginn einer Therapie werden eine HCV-Genotypisierung und eine HCV-Quantifizierung empfohlen. Die Genotypisierung dient der Festlegung der Therapiedauer, die Quantifizierung als Ausgangswert für die virämische Verlaufskontrolle (1, 49-51).

Eine Leberbiopsie wird nur dann empfohlen, wenn angenommen wird, dass die aus ihr folgenden Untersuchungsergebnisse Einfluß auf die Therapieentscheidung haben werden (1, 46, 50). Ungeachtet aller Risiken und methodischen Schwächen wird die Leberbiopsie nach wie vor als Goldstandard zur Bestimmung des Fibroseausmaßes (Staging) betrachtet (46, 50, 51). Das Fibroseausmaß wiederum gilt als stärkster Prädiktor des weiteren Krankheitsverlaufs bei Nichtbehandlung (46, 49). Bei fehlender oder uneindeutiger Zirrhose-Klinik kann ein postbiopisches Staging darüber entscheiden helfen, ob eine unmittelbare Therapie angeraten scheint oder eine Verlaufsbeobachtung mit gegebenenfalls in Abständen von 3-5 Jahren wiederholten Biopsien vorzuziehen ist (46, 49). Bei ausschließlich mit den Genotypen 2 oder 3 infizierten Patienten wird vielfach eine Therapie ohne vorheriges biopisches Staging begonnen, da diese Genotypen als positive Prädiktoren eines Therapieerfolges angenommen werden (49-51).

Klinische und virologische Kontrolluntersuchungen während der Therapie können in Abständen

von z. B. 1-3 Monaten erfolgen (50). Zur Dokumentation des Virämieverlaufs und Abschätzung des Therapieerfolges sind HCV-RNA-Serum-Quantifizierungen zu Therapiebeginn, 12 Wochen später, zu Therapieende und 6 Monate nach Therapieende üblich (50). Der Nichtnachweis von HCV-RNA im Serum 6 Monate nach Therapieende wird als „Sustained Viral Response“ (SVR) bezeichnet und als Surrogatparameter eines Therapieerfolges angenommen (52). Der Nichtnachweis von HCV-RNA im Serum 12 Wochen nach Therapiebeginn wird als „Early Viral Response“ (EVR) bezeichnet und gilt als SVR-Prädiktor (50). Der Nichtnachweis von HCV-RNA am Therapieende wird „End of Treatment Response“ (ETR) genannt. ETR und SVR verwendend werden therapierte Patienten in „Responder“, „Nonresponder“ und „Relapser“ unterteilt: „Nonresponder“ haben weder ETR noch SVR erreicht, „Relapser“ haben ETR, aber nicht mehr SVR erreicht, „Responder“ haben sowohl ETR als auch SVR erreicht.

Zur Verlaufsbeobachtung gehört desgleichen die Bestimmung des Serum-GPT-Wertes (1), über die auch das so genannte biochemische Therapieansprechen definiert wird (siehe S. 11).

Zur frühzeitigen Erfassung therapiebedingter Zytopenien und Schilddrüsenfunktionsstörungen ist darüberhinaus je nach Vorerkrankungen ein unterschiedlich engmaschiges Monitoring nötig (50).

1.1.10 Therapie

Optionen

Aktuellen Leitlinien folgend bestehen bei einer chronischen HCV-Infektion drei „Therapie“-Optionen: Lebertransplantation, Interferon-Ribavirin-basierte antivirale Therapie und Monitoring ohne therapeutische Intervention. Welches Vorgehen gewählt wird, ist individuell zu entscheiden - dabei in Betracht zu ziehen sind folgende Faktoren: der bestehende Leberfibrosegrad (als stärkster positiver Prädiktor des Krankheitsverlaufs ohne Behandlung), die Wahrscheinlichkeit schwerer, unerwünschter Arzneimittelwirkungen, die angenommene Wahrscheinlichkeit eines Therapieansprechens und das Vorliegen von Koerkrankungen (49, 50, 53).

Lebertransplantation

Die Lebertransplantation sollte bei Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose erwogen werden; Patienten mit kompensierter Hepatopathie hingegen gelten als Kandidaten für die antivirale Therapie bzw. für ein überwachendes Abwarten (50, 51, 53). Die Entscheidung zwischen antiviraler Therapie und Abwarten wird u. a. anhand des Ausmaßes der bestehenden Leberfibrose getroffen: Ein umgehender Therapiebeginn wird bei moderater bis starker Fibrose angeraten (Ishak ≥ 3 oder METAVIR $\geq F2$), ein beobachtendes Abwarten wird für den Fall

weniger stark ausgeprägter Fibrose empfohlen (Ishak < 3 oder METAVIR < F2) (50).

Interferon-basierte Therapie

Das Regime einer Interferon-Ribavirin-basierten antiviralen Therapie hängt vom HCV-Genotyp, eventuellen Vortherapien und Koerkrankungen ab. Sollten keine Kontraindikationen vorliegen, wird eine Kombination von pegyliertem Interferon-alpha und Ribavirin verabreicht (PEG-Interferon-alpha: einmal wöchentlich subkutan; 2a: fixe Dosierung, 2b: Dosierung pro kg Körpergewicht; Ribavirin: einmal täglich oral). Die Therapie von HCV/HIV-Koinfektionen, HCV-Genotyp-1- und Genotyp-4-Infektionen erfolgt über einen Zeitraum von 48 Wochen, die von Genotyp-2- und Genotyp-3-Infektionen über 24 Wochen. Non-Responder und Relapser nach Interferon-Monotherapien bzw. Therapien mit nicht-pegyliertem Interferon werden mit demselben Regime therapiert wie therapienaive Patienten. Für Nonresponder und Relapser nach gegenwärtigem Ersttherapie-Regime gibt es noch keine einheitlichen Empfehlungen: Retherapien sollten im Rahmen kontrollierter Studien erfolgen.

Für künftige Reevaluierungen der Therapieregime zeichnen sich zwei Trends ab: Verkürzung und Verlängerung der Therapiedauer. Verkürzung: Bei Nichtnachweis von HCV-RNA in der 4. Therapiewoche wird bei einer Genotyp-1-Infektion bereits zum Teil nur noch 24 Wochen und bei einer Genotyp-2 oder -3-Infektion nur noch 12 Wochen lang therapiert. Verlängerung: Bei Nachweis von HCV-RNA in der 12. aber nicht in der 24. Therapiewoche einer Genotyp-1-Infektion wird in manchen Fällen bereits 72 Wochen lang therapiert (50, 54, 55).¹

Neben den in den aktuellen Leitlinien empfohlenen Interferonen PEG-Interferon-alpha-2a und -2b wird in Studien - insbesondere bei Retherapie von Nonrespondern und Ersttherapie von Virusgenotyp-1-Patienten - ein weiteres Interferon verwendet: Consensus-Interferon. Ihm wird eine den PEG-Interferonen vergleichbare Wirkung zugeschrieben (56). Inwieweit es im Rahmen von Retherapien höhere Ansprechraten aufweist, ist noch unklar (57, 58).

Nebenwirkungen von Interferon und Ribavirin

Ein häufiger Grund für Non-Compliance, Therapieabbruch, Dosisreduktionen und Ablehnung einer Retherapie sind die Nebenwirkungen der antiviralen Therapie. Schwere, häufige und andere unerwünschte Wirkungen der beiden Wirkstoffe sind in Tabelle 3 aufgelistet.

¹ Die für den Herbst 2008 angekündigte Überarbeitung der Leitlinie der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) ist zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht (März 2009). Mitverfasser-Ankündigungen zufolge soll sie Therapiedauern von 24, 48 und 72 Wochen empfehlen.

Tab. 3: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs)

UAW-Gruppe	Wirkstoff	Einzelne UAWs
schwere UAWs	Interferon (22)	Depression Suizidalität anhaltende Hypothyreose Leukopenie und Thrombozytopenie durch Knochenmarkssuppression Krampfanfälle Sehbeeinträchtigung Gehörverlust Pankreatitis Interstitielle Pneumonie
	Ribavirin (22)	dosisabhängige hämolytische Anämie Teratogenität
häufige UAWs	Interferon (22)	Grippeähnliche Beschwerden Alopezie
	Ribavirin (22)	dosisabhängige hämolytische Anämie Pharyngitis Schlafstörungen Dyspnoe Juckreiz Hautausschlag Übelkeit Anorexie
übrige UAWs	Interferon (50)	Gereiztheit Konzentrationschwäche Gedächtnisschwäche Autoimmunstörungen (v.a. Thyreoiditis) Diarrhoe Schlafstörungen Gewichtsverlust Hautausschlag
	Ribavirin (50)	trockener Husten Sinus-Erkrankungen Gicht Diarrhoe

Therapieansprechen

Ohne Abbruch oder Dosisreduktion nach aktuellem Regime durchgeführte antivirale Therapien erzielen folgende SVR-Raten: 40-50 % SVR bei Genotyp 1, > 80 % SVR bei Genotyp 2 und 3, dazwischen liegende SVR-Raten bei Genotyp 4 (51, 54). Unter der Kombinationstherapie von PEG-Interferon-alpha + Ribavirin wurde sowohl die Verlangsamung des Fibrosefortschrittes als auch die Umkehrung von Zirrhose beobachtet (22).

1.1.11 Prädiktoren

Prädiktoren sind Surrogatparameter für einen klinisch relevanten Umstand. Ihre Bestimmung erfolgt zu einem früheren Zeitpunkt als die Bestimmung des relevanten Umstandes selbst – und ist idealerweise auch risiko- und komplikationsärmer, günstiger und einfacher (52).

Prädiktoren für klinisch relevanten Therapieerfolg

Prädiktoren für Therapieerfolg sollen einen klinisch relevant definierten Therapieerfolg voraussagen; sie werden bei Entscheidungen über Beginn, Fortführung oder Abbruch von Therapien genutzt, und der Zeitpunkt ihrer Bestimmung – der so genannte Surrogat-Endpunkt – ist häufig Endpunkt klinischer Studien. Als Voraussetzung für ihre Verwendung wird gefordert, dass zweierlei gezeigt werden konnte:

1. eine Korrelation zwischen dem Prädiktor des Therapieerfolges und dem klinisch relevant definierten Therapieerfolg
2. dass der Effekt der Therapie auf den Prädiktor präzise den Effekt der Therapie auf den klinisch relevant definierten Therapieerfolg vorhersagt. (Dies ist nötig, da eine im ersten Schritt gezeigte Korrelation auf einer Störvariable beruhen kann und nicht kausal sein muss.)

Wurden beide Aussagen bestätigt, so gilt der Prädiktor als validiert, wurden sie widerlegt, so gilt er als falsifiziert; konnten die Aussagen weder bestätigt noch widerlegt werden, so wird von einem vermeintlichen oder hypothetischen Prädiktor gesprochen. Für die Interferon-Ribavirin-basierte antivirale Therapie der chronischen HCV-Infektion existiert kein validierter Prädiktor des Therapieerfolges. Es liegen lediglich hypothetische Prädiktoren vor, die die erste Validierungsforderung erfüllen und für die die zweite Forderung bisher weder bestätigt noch widerlegt werden konnte (52).

Die Vermeintlichkeit dieser Therapieerfolgsprädiktoren erklärt sich aus der Definition des klinisch relevanten Therapieerfolges bei chronischer HCV-Infektion: Idealerweise würde die Therapie einer chronischen HCV-Infektion das Nichteintreten oder die Rückbildung (soweit

möglich) sämtlicher Krankheits- und Komplikations-Manifestationen bewirken. Die Entstehung einiger dieser Manifestationen – insbesondere die Entwicklung von Komplikationen einer Leberzirrhose inklusive der Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms - kann jedoch Jahrzehnte dauern und im Rahmen der Laufzeiten auch der längsten, gegenwärtig existierenden Studien noch nicht ausgeschlossen werden (52).

In Abwesenheit eines validierten Prädiktors wird zur Zeit vor allem der vermeintliche Prädiktor SVR (Sustained Viral Response = nachhaltiges virales Ansprechen) als Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg verwendet (52, 59). Für die Testung auf SVR ist kein bestimmtes Nachweisverfahren vorgeschrieben; es werden Methoden mit unterschiedlichen unteren Nachweisgrenzen verwendet.

Ein immer noch verwendeter Vorläufer von SVR als vermeintlicher Therapieerfolgsprädiktor ist das so genannte biochemische Ansprechen. Dieses ist durch eine Serum-GPT-Wert-Normalisierung sechs Monate nach Therapieende definiert (60-64).

SVR-Prädiktoren und SVR-Prädiktor-Prädiktoren

Neben nachhaltigem biochemischen und viralen Ansprechen existiert eine Vielzahl weiterer hypothetischer Prädiktoren, die lediglich aufgrund von Korrelation mit SVR postuliert wurden – nicht aufgrund von Korrelation mit klinisch relevant definiertem Therapieerfolg. Sie werden im Folgenden als SVR-Prädiktoren bezeichnet. Aufgrund von Korrelation mit einigen von ihnen wurden wiederum Prädiktoren postuliert, die man SVR-Prädiktor-Prädiktoren nennen könnte; sie korrelieren zumeist mit SVR-Prädiktoren, die durch die Viruslast zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Therapie definiert sind.

Zahlreiche Parameter wurden als SVR-Prädiktoren und SVR-Prädiktor-Prädiktoren publiziert; viele von ihnen sind strittig – eine wesentliche Rolle im Rahmen von Therapieentscheidungen spielen nur Virusgenotyp und Virämieverlauf in der Anfangsphase einer Therapie.

Der Virusgenotyp wird aktuellen Leitlinien folgend bei der Bestimmung der Therapiedauer und Ribavirin-Dosierung genutzt (siehe Kapitel „Interferon-basierte Therapie“ (S. 8)). Der Virämieverlauf in der Anfangsphase der Therapie kann über Abbruch oder Fortführung einer Therapie mitentscheiden.

Beispielhaft seien an dieser Stelle einige SVR-Prädiktoren und SVR-Prädiktor-Prädiktoren erwähnt; zu beachten ist, dass Störvariablenfreiheit und Pathomechanismus in vielen Fällen nicht geklärt sind und Assoziationen mit erwünschten/unerwünschten Viruslastparametern vielfach nur für bestimmte Therapieregime, HCV-Genotypen und Patientenpopulationen beschrieben wurden und für andere Regime, Genotypen und Patientengruppen nicht reproduziert werden

konnten.

Mit unerwünschten Viruslast-Befunden assoziierte Parameter sind: fortgeschrittene Leberfibrose, Leberzirrhose, Steatosis hepatis, männliches Geschlecht, höheres Lebensalter, höheres Körpergewicht, höherer Body-Mass-Index, erhöhte prätherapeutische Gamma-GT-Serumkonzentration (54), Zugehörigkeit zur Ethnie der Afroamerikaner (54), Insulinresistenz (65), hohe Leptin-Serumkonzentration (66), hohe prätherapeutische AFP-Serumkonzentration (67), hohe Interleukin-8-Serumkonzentration (68), erhöhte Ferritinämie (69, 70), Nichtansprechen auf aktuelles Therapieregime (71), HIV-Koinfektion und Alkoholkonsum (72).

Mit erwünschten Viruslast-Befunden assoziierte Parameter sind: PEG-Interferon-Ribavirin-Kombinationstherapie statt Monotherapie oder Therapieregime mit nicht-pegyliertem Interferon (54), geringe prätherapeutische Viruslast (54), Zugehörigkeit zu einer asiatischen Ethnie (73), höhere Ribavirin-Dosierung und höherer GPT-Quotient (Serum-GPT-Wert/ obere Serum-GPT-Normgrenze) (74).

1.2 CHC und Eisen

Die Fähigkeit des Eisens, Elektronen sowohl aufzunehmen als auch abzugeben, macht es zum Bestandteil zahlreicher Stoffwechselprozesse. Ein Überangebot an Eisen kann jedoch zell- und organschädigend sein. So führt u. a. die Bildung freier Radikale über verstärkten oxidativen Stress zu vermehrter Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren (75, 76); extremer Eisenüberschuss kann zur Fibrosierung parenchymatöser Organe wie z. B. der Leber führen (75). Parameter für den Körper-Eisengehalt wurden bei CHC-Patienten als häufig erhöht beschrieben (77).

Zur Rolle des Eisens im CHC-Verlauf werden in der Forschung zwei Hypothesen diskutiert (75, 76, 78, 79):

1. Hepatischer Eisenüberschuss aggraviert den Krankheitsverlauf.
2. Eisenentzugstherapien verbessern das Ergebnis Interferon-basierter Therapien.

1.2.1 CHC-Verlauf und hepatischer Eisenüberschuss

In der bisherigen Forschung wurden verschiedenste Parameter hepatischer Eisenüberladung mit einer Reihe unterschiedlicher und uneinheitlich definierter Aspekte des Verlaufs chronischer HCV-Infektionen korreliert: verstärkte Entzündungsaktivität (80-82), verstärkte Fibroseentwicklung (80, 81, 83), Hepatokarzinogenese (84, 85), Nichtansprechen auf IFN-Ribavirin-Kombinationstherapie (80) sowie Nichtansprechen auf IFN-Monotherapie (81, 86-93). Die Aussagekraft dieser Korrelationen ist strittig; so fanden Ryder et. al. (94) keine Korrelation

zwischen hepatischem Eisengehalt und Fibroseentwicklung. Guyader et. al. (95) fanden sie nur bei univariater, nicht aber nach multivariater Analyse. Bassett (78) zufolge hätten in den Studien, in denen hepatischer Eisengehalt tatsächlich gemessen und nicht bloß geschätzt worden wäre, keine Korrelationen zwischen hepatischem Eisengehalt und Therapieansprechen beschrieben werden können.

Darüber hinaus sei unklar – eine Korrelation zwischen erhöhtem hepatischem Eisengehalt sowie verstärkter Entzündungsaktivität und Fibroseentwicklung angenommen – ob erhöhter hepatischer Eisengehalt Mitursache oder Nebenprodukt verstärkter Entzündungsaktivität und Fibroseentwicklung sei (78).

1.2.2 Phlebotomie und CHC-Therapieerfolg

Aus den – wenn auch strittigen – Korrelationen zwischen hepatischer Eisenüberladung und diversen CHC-Verlaufparametern erwuchs die Hypothese, dass Interferon-Therapien vorausgehende Eisen-Entzugs-Therapien die Wahrscheinlichkeit eines Therapieansprechens erhöhen könnten (75). Eine Meta-Analyse von sechs prospektiven, randomisierten, kontrollierten Studien kam zu dem Schluß, dass Phlebotomien die Wahrscheinlichkeit erhöhten, SVR zu erreichen; fünf der ausgewerteten Studien bezogen sich auf IFN-Monotherapien, nur eine Studie bezog sich auf IFN-Ribavirin-Kombinationstherapien (79). Zur Bestätigung des Fazits wurden sowohl von den Autoren als auch von anderer Seite weitere Studien mit differenzierterem Design gefordert (78, 79).

1.2.3 Mechanismus der Eisenüberladung bei CHC

Der Mechanismus hepatischer Eisenüberladung bei chronisch HCV-Infizierten ist nicht geklärt – es existieren jedoch zwei sich nicht ausschließende Erklärungsversuche (96, 97).

Beobachtungen an Transgen-Mäusen, die das HCV-Polyprotein exprimieren, ergaben im Unterschied zu Beobachtungen an Kontroll-Mäusen folgendes: erhöhte Leber- und Serum-Eisen-Konzentrationen, verminderter Milz-Eisen-Gehalt, verringerte hepatische Hepsidin-Expression, verstärkte Expression von Ferroportin in Leber, Duodenum und Milz, herunterregulierte Hepsidin-Promotor-Aktivität sowie erhöhte Konzentrationen an ROS (Reactive Oxygen Species). Folgende Regelkreis-Fehlfunktion wird vermutet: HCV induziere eine Erhöhung von ROS, vermehrt vorliegende ROS inhibierten die Hepsidin-Expression, durch gleichzeitig erhöhte Ferroportin-Expression in Milz und Duodenum käme ein erhöhter Serum-Eisen-Gehalt zustande; wieso dieser erhöhte Serum-Eisen-Gehalt bei erniedrigter Hepsidin-Expression und erhöhter hepatischer Ferroportin-Expression (sprich erhöhtem Eisenexport aus Hepatozyten) zu erhöhtem

Eisengehalt in Hepatozyten führe, bleibt unklar. Erklärend wird vermutet, dass die Ferroportin-Expression in der Leber weniger stark ansteige als die in Milz und Duodenum (96).

Dem zweiten Erklärungsmodell folgend erhöht Eisen die Translation der HCV-RNA mit Hilfe von zelleigenen Proteinen (97). Die Signalkette ist jedoch auch in diesem Fall nicht geklärt.

1.3 Ferroportin

1.3.1 Erstbeschreibungen

Das Ferroportin-Gen wurde von drei voneinander unabhängigen Forschungsgruppen erstmals im Februar und Juni 2000 beschrieben (98-100); das exprimierte Protein wurde IREG1, Ferroportin1 bzw. MTP1 genannt und sein Vorkommen in folgenden Geweben vermerkt: im unreifen und reifen Retikuloendothelialen System, auf basolateralen Membranen duodener Epithelzellen, auf der basolateralen Oberfläche plazentärer Synzytiotrophoblasten sowie in Muskel- und ZNS-Zellen des Embryo. Seine Überexpression führe zum Absinken Zytosolischer Eisen- und Ferritin-Werte (98-100).

1.3.2 Gen und Protein

Das Ferroportin-Gen wurde im humanen Genom auf dem Chromosom 2q32 lokalisiert (101). Es beinhaltet 8 Exone mit einer Gesamt-Transkriptionslänge von 3429 Basenpaaren (<http://www.ensembl.org> (ENSG00000138449)). Eine Promotorsequenz wurde noch nicht beschrieben. Allerdings wird von einer Sequenz im 5'-UTR Bereich der nicht translatierten cDNA angenommen, dass sie ein IRE (Iron Responsive Element) darstelle (100).

Das vom Ferroportin-Gen kodierte Protein hat eine Länge von 571 Aminosäuren (98). Es ist multimerisch (102), zellmembranständig und weist 9 Transmembrandomänen auf. Sein geschätztes Molekulargewicht beträgt 62542 Dalton (<http://www.hprd.org> (ferroportin 1)).

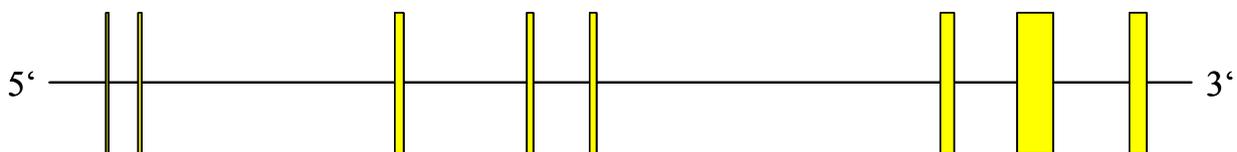


Abb. 1: Darstellung der Größenverhältnisse von translatierten und nichttranslatierten Bereichen des Ferroportin-Gens; gelbe Blöcke: translatierte Bereiche; Rest: nichttranslatierte Bereiche

1.3.3 Funktion

Dem heutigen Kenntnisstand nach ist das Ferroportin-Protein ein zellmembranständiges Protein und der einzige Exporter intrazellulären Eisens in den Extrazellularraum (103). Im Rahmen von

systemischen Eisen-Homöostase-Modellen spielt es somit eine zentrale Rolle, da diese postulieren, dass die Anpassung an Veränderungen des systemischen Eisenbedarfs durch Änderungen des Eisenexports erfolgt; Änderungen des Eisenimports hingegen dienen der Anpassung an Veränderungen im lokalen Eisenbedarf (104).

1.3.4 Steuerung des Eisenexports

Es wird angenommen, dass das Ausmaß der Eisensekretion Ferroportin-exprimierender Zellen von zwei Faktoren bestimmt wird: von der Lokalisation der Zelle und vom Ausmaß der Sekretion des Leber-Peptidhormons Heparin (105).

Heparin

Heparin - 2001 erstmals beschrieben (106) – wird gegenwärtig als vermutlich das zentrale Steuerungselement der Eisen-Homöostase betrachtet (103). Von Hepatozyten sezerniert gelangt es in das Plasma und bindet von hier aus an zellmembranständiges Ferroportin. Der entstandene Komplex wird per Endozytose aufgenommen und lysosomatisch abgebaut; der Eisenexport Ferroportin-exprimierender Zellen nimmt ab (105).

Es wird vermutet, dass vermehrter systemischer Eisenbedarf die Heparin-Sekretion verringert, und so den Eisenexport aus Ferroportin-exprimierenden Zellen steigert. Umgekehrt wird angenommen, dass systemischer Eisenüberschuss zu vermehrter Heparin-Sekretion und somit vermindertem Eisenexport aus Ferroportin-exprimierenden Zellen führt (104).

Auch Entzündungen führten zu vermehrter hepatischer Heparin-Ausschüttung und vermindertem Ferroportin-vermitteltem Export intrazellulären Eisens (105, 107).

Die molekularen Mechanismen, mit denen die Heparin-Expression kontrolliert wird, sind größtenteils noch unklar (108).

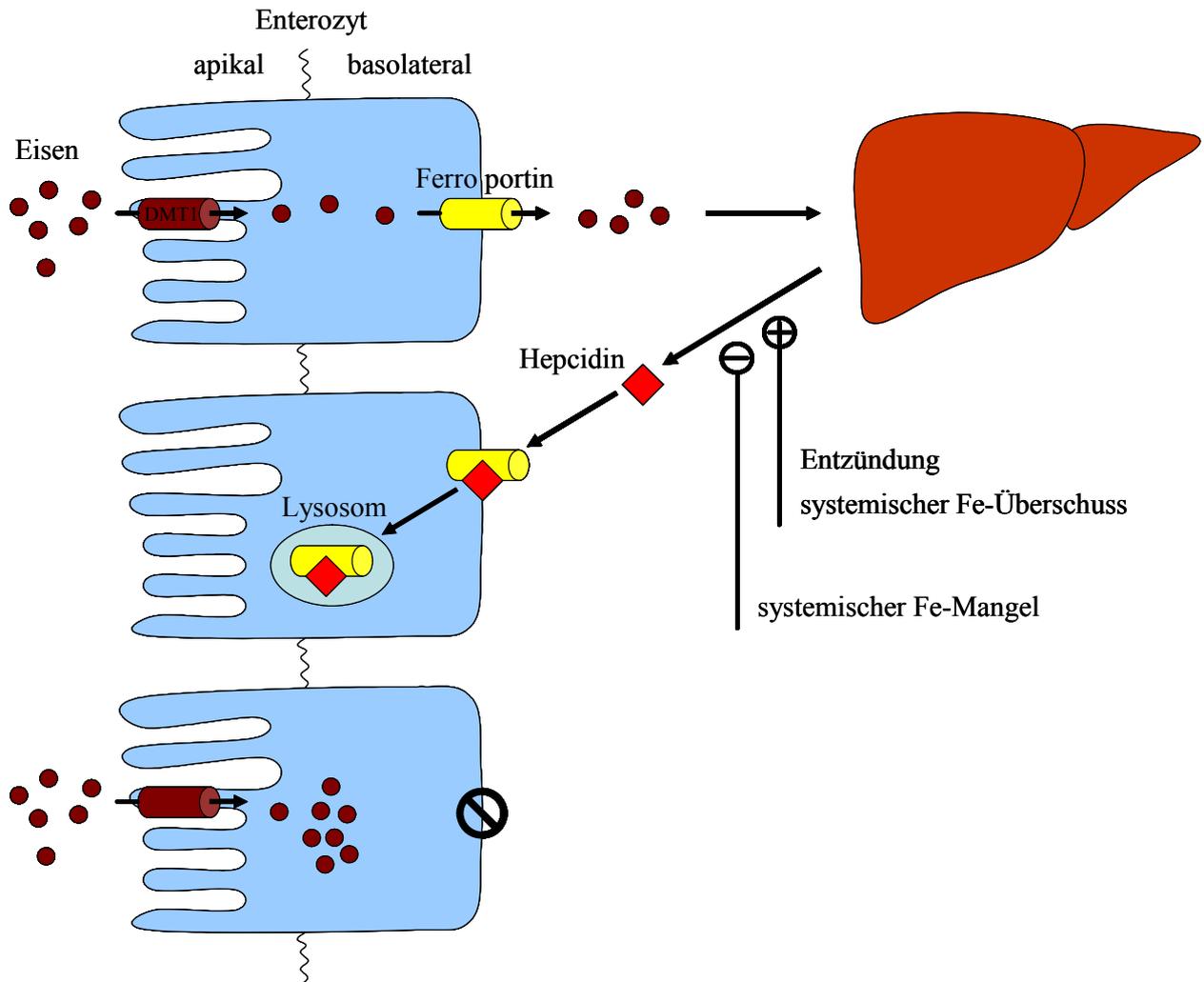


Abb. 2: Steuerung des Exports intrazellulären Eisens durch die Interaktion von Ferroportin, Heparidin und systemischem Eisenbedarf. Beispielzelle: Enterozyt.

Zell-Lokalisation

Das Ausmaß der Expression von Ferroportin scheint abhängig von der Lokalisation der exprimierenden Zelle zu sein: Am stärksten wird Ferroportin von reifen Enterozyten, plazentären Synzytiotrophoblasten und Makrophagen exprimiert (109).

Im Darm korreliert die Ferroportin-Expression fast ausnahmslos mit der Bioverfügbarkeit von Eisen: im Duodenum sind beide am höchsten, in Jejunum und Ileum fast nicht festzustellen; die Ausnahme bildet das Kolon, in dem Eisen als nicht bioverfügbar angenommen, Ferroportin jedoch mäßig exprimiert wird (109).

Bei den Makrophagen, die Ferroportin besonders stark exprimieren, handelt es sich um Pulpa-Makrophagen der Milz, Kupfersternzellen der Leber sowie Knochenmarks-Makrophagen; all diese Zellen recyceln Eisen aus dem Hämoglobin phagozytierter Erythrozyten (109, 110).

Organe, in denen eine mäßige Ferroportin-Expression beschrieben wurde, sind Niere, Lunge (98)

sowie Muskel und ZNS des Embryo (100). Die Funktion von Ferroportin in diesen Organen ist noch unklar (109).

1.3.5 Transportertyp

Die Energiequelle für den Eisenexport via Ferroportin ist bisher nicht identifiziert – auch ist nicht geklärt, ob es sich bei Ferroportin um einen Austausch- oder Kotransporter handelt (109). Unklar ist ebenfalls, welche Eisenform mittels Ferroportin transportiert wird; als wahrscheinlicher wird angenommen, dass Ferroportin zweiwertiges statt dreiwertiges Eisen transportiert; Eisen(III) ist praktisch unlöslich, sein Transport nur bei Anwesenheit eines Chelators möglich; Eisen(II) andererseits ist das Eisen mit der höchsten Bioverfügbarkeit und es gibt Hinweise, dass das zytosolische Eisen Eisen(II) sei (109, 111).

1.3.6 Synonyme und Abkürzungen

Zur Bezeichnung des Ferroportin-Gens und des von ihm exprimierten Proteins existiert eine Reihe synonyme Abkürzungen und Namen: SLC11A3 (Solute Carrier Family 11, Member A3), SLC40A1, SLC40, FPN1 (Ferroportin1), MTP1 (Metal Transporter Protein 1), IREG1 (Iron Regulated Transporter 1), HFE4. Die zur Zeit gängigste Bezeichnung für Gen und Protein ist Ferroportin.

1.3.7 Hämochromatose Typ IV

Als Hämochromatose Typ IV wird eine seltene, autosomal dominante Form der Hämochromatose bezeichnet, die auf Mutationen im Ferroportin-Gen zurückgeführt wird (112-117). Patienten mit Typ IV Hämochromatose weisen ein anderes klinisches Bild auf als Patienten mit HFE-mutationsbedingter Hämochromatose (109). Im einzelnen wurden folgende Besonderheiten beobachtet: ein früher Anstieg des Serum-Ferritins bei niedriger bis normaler Transferrin-Sättigung, eine fortschreitende intrazelluläre Eisenablagerung - vor allem in retikuloendothelialen Makrophagen, eine gering ausgeprägte Anämie und eine niedrige Toleranz gegenüber Phlebotomien (118).

Die im Folgenden aufgelisteten, mit Hämochromatose Typ IV in Verbindung gebrachten Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit weder gefunden noch gesucht, da es sich um seltene Variationen der Gensequenz handelt und die Arbeit nach dem potentiellen Effekt von häufigen Sequenzvarianten fragt: Asn144His (115), Ala77Asp (114), Val162del (117), Asp157Gly, Gln182His, Gly323Val (119), Asp181Val, Gly80Val und Gly267Asp (120).

Tab. 4: Hämochromatose-Typen (121, 122)

Krankheits-Bezeichnung	Gen	Vererbung	Phänotyp
Hämochromatose Typ I	HFE	autosomal rezessiv	parenchymale Eisenüberladung in Leber, Pankreas, Herz und Haut; meist manifestierend als Leberfibrose, -zirrhose und Diabetes.
Hämochromatose Typ II/ Juvenile Hämochromatose	Typ IIa: HJV Typ IIb: HAMP	autosomal rezessiv	Manifestation meist vor 30. Lebensjahr; oft schwere kardiale und endokrine Funktionsstörungen ohne hepatische Manifestation; schnellerer und schwererer Verlauf als Typ I; oft letal mit Herzversagen als Todesursache.
Hämochromatose Typ III	TFR2	autosomal rezessiv	ähnlich dem der Typ I Hämochromatose
Hämochromatose Typ IV/ Ferroportin Disease	Ferroportin	autosomal dominant	typisch: Eisenüberladung in Makrophagen, Anämie; Leberfibrose in Einzelfällen. atypisch: Eisenüberladung in Hepatozyten; Leberzirrhose in Einzelfällen.

HAMP: Gen, das Hepcidin exprimiert

HJV: Haemojuvelin (Synonym: HFE2)

TFR2: Transferrin Rezeptor 2 (Synonym: HFE3)

Die Hämochromatose Typ I ist die in Europa häufigste hereditäre Hämochromatose-Form. Die Typen II-IV sind vergleichsweise selten, teils nur durch Fallberichte belegt und mit einer Vielzahl von Mutationen assoziiert; die meisten dieser Mutationen werden nur in einzelnen Familien nicht aber familienübergreifend in ganzen Populationen beschrieben (122).

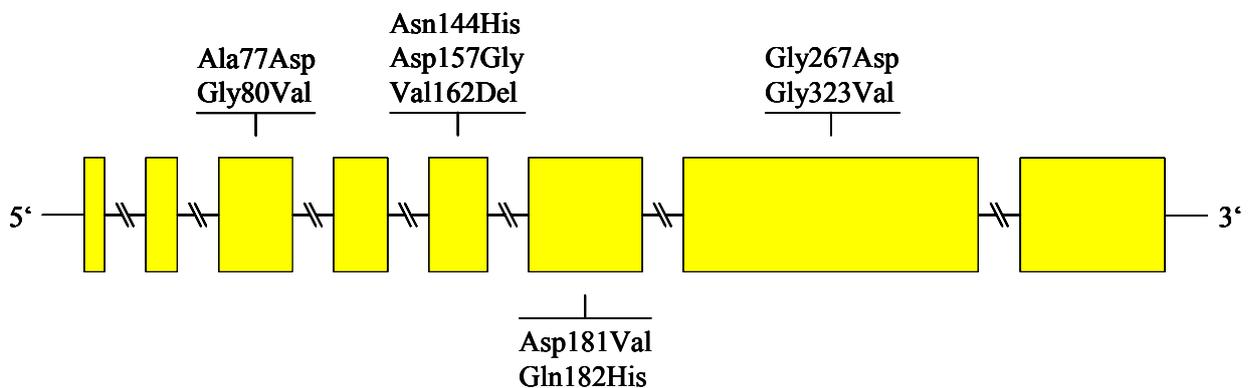


Abb. 3: mit Hämochromatose Typ IV assoziierte Mutationen des Ferroportin-Gens

2 Aufgabenstellung

Die zum gegenwärtigen Zeitpunkt etablierten medikamentösen Therapien chronischer HCV-Infektionen bestehen aus einer Kombination der Wirkstoffe Interferon und Ribavirin. Die SVR-definierten Ansprechraten dieser Therapien liegen bestenfalls bei $> 80\%$ (Virusgenotypen 2 und 3), schlechtestenfalls bei $40\text{-}50\%$ (Virusgenotyp 1) (51, 54). Diese Ungewissheit in Bezug auf Therapieerfolg, das Ausmaß der Nebenwirkungen und die lange Dauer der Behandlung führen häufig zu Therapieabbrüchen bzw. zum Ablehnen erneuter Therapieversuche.

Patientenseitige Prädiktoren der Therapieerfolgswahrscheinlichkeit könnten Erkrankten bei der Entscheidungsfindung und Behandelnden bei Beratung und individueller Therapiegestaltung helfen. Genetische Polymorphismen als Prädiktoren von Therapieerfolgswahrscheinlichkeit könnten idealerweise durch die Analyse ihrer biochemischen Funktion auch zu einer Verbesserung der Therapie selbst führen.

Die in der gegenwärtigen Forschung diskutierte Beobachtung, dass hepatischer Eisenüberschuss den Verlauf einer CHC aggraviere (75, 76, 78, 79), führte zu der Idee, ein den hepatischen Eisengehalt beeinflussendes Gen auf Polymorphismen hin zu untersuchen und gefundene Polymorphismen mit Parametern für CHC-Therapieverlauf zu korrelieren. Die Wahl fiel auf Ferroportin – das Gen, das den zurzeit einzig bekannten Exporter intrazellulären Eisens kodiert. Diese Arbeit stellt also folgende Frage: Gibt es Polymorphismen im Ferroportin-Gen, die Vorhersagen über die Erfolgswahrscheinlichkeit Interferon-basierter CHC-Therapien erlauben könnten?

Zur Identifizierung potentiell prädiktiver Polymorphismen im Ferroportin-Gen wurde dieses zuerst bei 65 Probanden (50 Patienten + 15 Gesunde) sequenziert; von elf beobachteten Polymorphismen wurden fünf durch Haplotypenanalyse als haplotypendeterminierend identifiziert; die Ausprägung dieser Polymorphismen wurde (durch Sequenzierung und Verwendung von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen) bei 200 weiteren Patienten bestimmt; vorliegende Parameter für Therapieerfolg wurden dichotomisiert und mit den Ausprägungen der bestimmten Polymorphismen korreliert. Da es sich bei dieser Arbeit nicht um eine hypothesenprüfende sondern um eine hypothesengenerierende Untersuchung handelt, wurde beim statistischen Testen auf eine alpha-Adjustierung verzichtet.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden-Rekrutierung

3.1.1 Berliner Kontrollen

Fünfzehn klinisch gesunde Mitarbeiter, bei denen weder ein anti-HCV-Antikörper-Test noch eine HCV-RNA-Bestimmung durchgeführt wurde, stellten ihre DNA als Kontroll-DNA zur Verfügung.

3.1.2 Berliner Patienten

Zur Suche nach Polymorphismen im Ferroportin-Gen wurden neben den gesunden 15 Kontroll-
Probanden auch 50 CHC-Patienten rekrutiert. Zur Vermeidung eines Bias in Richtung bestimmter Subgruppen wurden als einzige Einschlusskriterien das Vorliegen einer CHC-Diagnose und das Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses zur Teilnahme an der Studie verwendet – Ausschlusskriterien bestanden nicht. Die Patienten-Rekrutierung erfolgte in der „Studienambulanz Hepatologie“ des „Forschungsbereiches Klinische Hepatologie“ der „Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie“ des „Campus Charité Mitte“ der „Charité – Universitätsmedizin Berlin“.

3.1.3 Tübinger Patienten

Die folgenden Kriterien beziehen sich auf die Rekrutierung von Patienten für die Phase-III-Studie „Kombinationsbehandlung der chronischen Hepatitis C mit Consensus-Interferon und Ribavirin - Therapieoptimierungsversuch“; die Patienten wurden durch die Spezialambulanz „Chronische Virushepatitis“ der Arbeitsgruppe „Chronische Hepatitis“ der Abteilung „Innere Medizin I, Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie“ des „Universitätsklinikums Tübingen“ rekrutiert. Die Rekrutierung erfolgte im Zeitraum Februar 2000 bis März 2001. Die DNA von 200 rekrutierten Patienten wurde der Arbeitsgruppe Schmidt zur Verfügung gestellt.

Einschlusskriterien

- Positiver anti-HCV-Test
- Positiver HCV-RNA-Nachweis
- Chronizität der HCV-Infektion
- Therapienaivität: d. h. eine Interferon-Mono- oder Interferon-Ribavirin-Kombinations-
therapie wurde noch nicht durchgeführt

- GPT über dem Normbereich
- Alter 18-60 Jahre
- Bereitschaft für die Dauer der Therapie und 6 Monate danach Antikonzeption durchzuführen

Ausschlusskriterien

- Leberzirrhose Child B und C
- Serumkreatinin > 1,7 mg/dl
- Leukozytopenie < 2.500/ml
- Thrombozytopenie < 100.000/ml
- Hb-Ausgangswert < 12 g/dl
- Autoimmunerkrankungen
- Nicht HCV-bedingte chronische Lebererkrankungen
- HBsAg positiv
- Schwangerschaft, Schwangerschaftswunsch oder Stillperiode
- Malignom oder andere schwere Grund- oder Begleiterkrankung
- Alkoholabusus
- Fortgesetzter Drogenabusus
- HIV-Infektion
- Eingeschränkte Geschäftsfähigkeit oder eingeschränkte Einwilligungsfähigkeit
- Manifeste oder latente Depression oder andere psychiatrische Krankheit
- Therapie mit Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren

3.2 Ethikvotum

Die Ethikkommission Berlin beschied den Antrag „Genetische Untersuchung von Response Genen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C“ am 08.07.2004 positiv.

3.3 Material

3.3.1 Blutproben

Die an der Untersuchung beteiligten Patienten wurden in Kooperation vom „Universitätsklinikum Tübingen“ und der „Charité – Universitätsmedizin Berlin“ geworben. Sie wurden in der jeweiligen Klinik informiert, wo ihr schriftliches Einverständnis eingeholt und ihnen Blut abgenommen wurde. Die Isolierung der DNA der Patienten aus Tübingen erfolgte vor Ort durch die dortige Arbeitsgruppe. Die bei +4 °C gekühlten 9ml-EDTA-Monovetten der

Patienten der Charité wurden dem Labor der Arbeitsgruppe Schmidt zugestellt und dort wie im Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben weiterverarbeitet.

3.3.2 Geräte

- Gefrierschrank (Sanyo, München)
- Zentrifugen (Heraeus, Hanau; Roth, Karlsruhe)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Vortex-Geräte (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA; Heidolph Instruments, Schwabach)
- Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)
- Thermocycler (Biometra, Göttingen)
- Analysewaage (Sartorius, Göttingen)
- Magnetrührer (Heidolph Instruments, Schwabach; Variomag, Daytona Beach, Florida, USA)
- Thermometer (Amarell, Kreuzwertheim)
- Power Supply (Biometra, Göttingen)
- Elektrophoresekammer (Owl Separation Systems, Wiesbaden; Bio-Rad, München; Biometra, Göttingen)
- Rüttler (Biometra, Göttingen)
- Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich)
- Kameras (Polaroid, Dreieich)
- ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)

3.3.3 Chemikalien

- QIAamp™ DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Ethanol (100 %) (Merck, Darmstadt)
- HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden)
- Primer (Qiagen, Hilden; MWG-Biotech, Ebersberg)
- HPLC-H₂O
- TAE-Puffer (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK)
- TBE-Puffer (Roth, Karlsruhe)

- Agarose (Abgene, Hamburg)
- Elektrophoreseauftragspuffer (Roth, Karlsruhe)
- DNA-Marker (Roth, Karlsruhe)
- SYBR Green (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)
- DyeEx[™] 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden)
- AbiPrism[®] Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs, Frankfurt a. M.)
- NEBuffer (New England BioLabs, Frankfurt a. M.)
- 25 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden)
- Purified BSA (New England BioLabs, Frankfurt a. M.)
- dNTPs (Qbiogene, Heidelberg)
- 10x PCR Buffer 15 mM MgCl₂ (Roche, Mannheim)
- HotStarTaq (Qiagen, Hilden)

3.3.4 Software

SPSS Version 15.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

3.4 Experimentelle Methoden

3.4.1 DNA-Isolierung

Prinzip

DNA befindet sich in Zellkernen. Um sie zu isolieren, müssen kernhaltige Zellen gewonnen werden – in ausreichender Menge und Konzentration. Ihre Membranen ebenso wie die ihrer Kerne werden lysiert, um aus dem anschließend vorliegenden Gemisch aus Lyseagenzien und Bestandteilen lysierter Zellen und Zellkerne die DNA heraustrennen zu können. Das Lyseprodukt wird durch Säulen zentrifugiert, an deren Matrix die DNA adsorbiert und adsorbiert bleibt, während die übrigen in der Säule hängen gebliebenen Bestandteile des Lyseproduktes in zwei Waschgängen mit unterschiedlichen Waschpuffern aus der Säule eluiert werden. Auch während des folgenden Auszentrifugierens von Waschpufferresten aus der Säule bleibt die DNA

an der Säulenmatrix adsorbiert. Erst durch einen Elutionspuffer wird die Bindung an die Säulenmatrix gelöst. Gelöst im Elutionspuffer wird die DNA schließlich aus der Säule herauszentrifugiert und liegt in dieser Lösung letztlich zur weiteren Verwendung vor.

Detail

Als kernhaltige Zellen wurden Leukozyten gewählt. Gewonnen wurden sie durch venöse Blutentnahme, konzentriert durch Zentrifugation der Blutprobe. Für die Arbeitsschritte von der Lyse bis zur Elution wurde das QIAampTM DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die bei +4 °C gelagerten EDTA-Blutproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend mit 2.800 rpm 10 min. zentrifugiert. Hierdurch trennten sich sichtbar drei Phasen voneinander: eine breite obere – klar und zellarm – eine breite untere – dunkel und erythrozytenreich – und eine schmale mittlere – milchig und leukozytenreich. Der leukozytenreichen so genannten Interphase, dem so genannten „Buffy-Coat“ wurden 250 µl entnommen; zur Lyse der die DNA umschließenden Membranen von Leukozyten und Leukozytenkernen wurden die der Interphase entnommenen 250 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zügig mit 25 µl Protease und 250 µl Puffer AL versetzt, gevortext und bei 56 °C 10 min. inkubiert. Puffer und Temperatur sollten die optimale Aktivität der lysierenden Protease ermöglichen.

Kam es vor oder während der Zentrifugation zu einer Hämolyse, kam es nicht zu der sichtbaren Drei-Phasen-Bildung. In diesem Fall wurden dem Zentrifugat 250 µl auf der Höhe des Gefäßes entnommen, auf der anderenfalls die Interphase erwartet worden wäre. Diese 250 µl wurden ebenso weiterbehandelt wie die dem „Buffy-Coat“ entnommenen.

Nach der 10minütigen Inkubation fällt man die DNA wie folgt: Nach kurzem Anzentrifugieren wurden dem Ansatz 250 µl Ethanol (100 %) zugegeben und das Gemisch wurde gevortext, bis es homogen schien. Es wurde nun auf eine so genannte „Spin Column“ pipettiert und in dieser bei 8.500 rpm 1 min. zentrifugiert. blieb nach dem Zentrifugieren Flüssigkeit über dem Filter der „Spin Column“ stehen, so wurde erneut zentrifugiert: 1 min. bei 12.000 rpm. Nach diesem Zentrifugieren eventuell noch über dem Filter verbleibender Ansatz wurde abpipettiert und verworfen. Spätestens nach diesem Arbeitsschritt wurde die „Spin Column“ in ein frisches „Collection Tube“ überführt, mit 500 µl Waschpuffer AW1 versetzt und bei 8.500 rpm 1 min. zentrifugiert. Anschließend wurde die „Spin Column“ wiederum in ein neues „Collection Tube“ überführt, mit 500 µl Waschpuffer AW2 versetzt und mit 13.000 rpm 3 min. zentrifugiert. Schließlich wurde die „Spin Column“ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und es wurden 200 µl Elutionspuffer AE auf den Filter gegeben. Nach frühestens 1 min. Inkubation wurde die „Spin

Column“ bei 9.000 rpm 1 min. zentrifugiert und die zuvor an der Filtermatrix adsorbierte DNA - gelöst im Elutionspuffer AE – im Reaktionsgefäß aufgefangen.

Zur langfristigen Lagerung wurde die im Elutionspuffer gelöste DNA bei -20 °C eingefroren. Die mittelfristig für die PCR benötigte Menge gelöster DNA wurde bei +4 °C aufbewahrt.

3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Prinzip

Damit ein bestimmter Abschnitt der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese oder Sequenzierung indirekt sichtbar gemacht werden kann, muss er vielfach vorliegen. Die PCR dient der Vervielfachung eines bestimmten DNA-Abschnittes.

Ein PCR-Reaktionsansatz enthält isolierte DNA, ein so genanntes Primerpaar (Vorwärts- und Rückwärtsprimer), eine DNA-Polymerase, Nukleotide, sowie Zusätze, die die nötige Aktivität der Polymerase gewährleisten sollen.

Eine PCR ist die zyklische Wiederholung der Reaktionen Denaturierung, Annealing und Elongation:

1. Denaturierung: Der Ansatz wird bis zu einer Temperatur erhitzt, bei der sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden komplementären DNA-Strängen auflösen. Die komplementären DNA-Stränge lösen sich voneinander und liegen jetzt einzeln vor.
2. Annealing: Der Ansatz wird nun auf eine Temperatur abgekühlt, bei der sich zwischen den einzeln vorliegenden DNA-Strängen und den Primern Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Es entstehen Hybride. Die Annealing-Temperatur ist spezifisch für die verwendeten Primer und muss empirisch ermittelt werden.

Exkurs Primer: Primer sind Oligonukleotide, die in ihrer Basenabfolge komplementär zu Anfang und Ende eines zu vervielfachenden DNA-Abschnittes sind: Der Vorwärtsprimer ist komplementär zum Anfang des DNA-Abschnittes, gelesen vom 3'- zum 5'-Ende der antisense-DNA; der Rückwärtsprimer ist komplementär zum Ende des DNA-Abschnittes, gelesen vom 3'- zum 5'- Ende der sense-DNA.

Nach dem Annealing liegen zwei Arten von Makromolekülen vor: Hybride aus sense-DNA und Rückwärtsprimern sowie Hybride aus antisense-DNA mit Vorwärtsprimern.

3. Elongation: Nach dem Annealing wird der Reaktionsansatz auf eine Temperatur erhitzt, bei der die Polymerase idealerweise optimal aktiv wäre. Die Polymerase bindet Nukleotide an die 3'-Enden von Primern, die mit DNA-Strängen hybridisiert sind; dabei werden Nukleotide „angebunden“, die komplementär zum jeweils „gegenüberliegenden“ Nukleotid des DNA-Stranges sind, an den der Primer gebunden ist.

Nach Beendigung des Elongationsschrittes liegt erneut doppelsträngige DNA vor.

Am Ende des ersten PCR-Zyklus liegen folgende zwei Typen von DNA-Molekülen vor:

1. Hybride aus kompletter sense-DNA und inkompletter antisense-DNA. Die antisense-DNA ist inkomplett, da sie erst mit dem ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers beginnt.
2. Hybride aus kompletter antisense-DNA und inkompletter sense-DNA. Die sense-DNA ist inkomplett, da sie erst mit dem ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers beginnt.

Durchlaufen diese Produkte des ersten PCR-Zyklus einen weiteren PCR-Zyklus, so entstehen zusätzlich folgende Moleküle:

1. Sense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers beginnt und mit dem Nukleotid endet, das komplementär zum ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers ist. Daran gebunden ist antisense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers anfängt.
2. Antisense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers beginnt und mit dem Nukleotid endet, das komplementär zum ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers ist. Daran gebunden ist sense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers anfängt.

Erst nach dem dritten PCR-Zyklus liegen auch doppelsträngige Kopien eines durch das Primerpaar definierten DNA-Abschnittes vor:

Sense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers anfängt und mit dem Nukleotid aufhört, das komplementär zum ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers ist. Daran gebunden eine komplementäre antisense-DNA, die mit dem ersten Nukleotid des Rückwärtsprimers anfängt und mit dem Nukleotid aufhört, das komplementär zum ersten Nukleotid des Vorwärtsprimers ist.

Die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes findet erst nach dem dritten PCR-Zyklus statt.

Die PCR wird in einem programmierbaren Temperaturwechselgerät (Thermocycler) durchgeführt.

Eine Beschreibung der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis veröffentlicht, der für die von ihm entwickelte Methode 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Anfänglich wurde die PCR mit der DNA-Polymerase aus *Escherichia (E.) coli* durchgeführt, heutzutage wird eine Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die so genannte Taq-Polymerase. Dieses hitzestabile Enzym kann dem Reaktionsansatz bereits vor der ersten Denaturierungsphase in für alle Zyklen ausreichender Menge zugegeben werden.

Detail

Die verwendeten Reaktionsansätze, Thermocycler-Programme, Primer und Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: Bei PCRs verwendete Primer, Reaktionsansätze, Thermocycler-Programme und Annealing-Temperaturen; Fragmentgrößen (=Größen der PCR-Produkte); die Primer sind jeweils vom 5'- zum 3'-Ende notiert.

PCR	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Fragment-Größe	Reaktions-Ansatz	Thermocycler-Programm	Annealing-Temperatur
Slc11a3 Exon 1	ccccgactcggataa gagc	agagccacattctccagaa	498 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 1A	agtcggaggctgcag gga	gctctcgtgaggtgctgt	339 Bp	Nr. 1	Nr. 1	64 °C
Slc11a3 Exon 1B	ccgcttcataaggcttt gc	agcagagccacattcctcca	329 Bp	Nr. 1	Nr. 1	63,5 °C
Slc11a3 Exon 2	cgtggttgtcctgcaa agt	tcatggggaagatcttcgat	367 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 3	catctgagcagtattca atctaagag	tctagttgtgttctcttgc	400 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 4	ggtgtgatcctctgggt tgt	agctcaaagcattttcatcc	379 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 5	ggttaggacattatgcc cattg	cctcatttatcaccaccgatt	395 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 6	agtgggacttgacca aaca	tcttcaccaacatttaaggtct ga	490 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 7A	ccttggtggaattctta gat	cgacgtagccaagtaaaagc	500 Bp	Nr. 1	Nr. 1	58 °C
Slc11a3 Exon 7B	ggactgagtggtccat cct	catttagggaacatttcagatc a	596 Bp	Nr. 1	Nr. 1	58 °C
Slc11a3 Exon 8	tgtgattgaaatgtatg cctgta	acaccagccatttattgga	466 Bp	Nr. 1	Nr. 1	60 °C
HFE H63D	acatggttaaggcctgt tgc	gccacatctggcttgaatt	208 Bp	Nr. 2	Nr. 2	55 °C
HFE C282Y	tggcaagggtaaacag atcc	ctcaggcactcctctcaacc	387 Bp	Nr. 2	Nr. 2	55 °C
PM8 PCR1	agtgggacttgacca aaca	tcttcaccaacatttaaggtct ga	490 Bp	Nr. 3	Nr. 1	60 °C
PM8 PCR2	GGTATCCATG TGCGTGGAAaT	tcttcaccaacatttaaggtct ga	185 Bp	Nr. 4	Nr. 1	60 °C

Reaktionsansatz 1

HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Vorwärtsprimer	0,6 µl
Rückwärtsprimer	0,6 µl
HPLC-H ₂ O	22,8 µl
DNA	1,0 µl

Reaktionsansatz 2

HPLC-H ₂ O	24,6 µl
10x PCR Buffer 15 mM MgCl ₂	3,0 µl
dNTPs	0,6 µl
Vorwärtsprimer	0,3 µl
Rückwärtsprimer	0,3 µl
HotStarTaq	0,2 µl
DNA	1,0 µl

Reaktionsansatz 3

HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Vorwärtsprimer	0,3 µl
Rückwärtsprimer	0,3 µl
HPLC-H ₂ O	22,8 µl
DNA	1,0 µl

Reaktionsansatz 4

HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Vorwärtsprimer	0,6 µl
Rückwärtsprimer	0,6 µl
HPLC-H ₂ O	22,8 µl
25 mM MgCl ₂	1,8 µl
PCR1-Produkt	0,05 µl (sic!)

Thermocycler-Programm 1

Heizdeckel-Temperatur	105 °C
1. Vor der Denaturierung	95 °C, 15 min.
2. Denaturierung	95 °C, 30 sec.
3. Annealing	Temperatur siehe Tab. 5, 1 min.
4. Elongation	72 °C, 45 sec.
5. Finale Elongation	72 °C, 5 min.
6. Kühlung	4 °C, ohne zeitliche Begrenzung
Anzahl der Zyklen (d. h. Wiederholung der Schritte 2. - 4.): 30	

Thermocycler-Programm 2

Heizdeckel-Temperatur	105 °C
1. Vor der Denaturierung	92 °C, 5 min.
2. Denaturierung	92 °C, 1 min.
3. Annealing	Temperatur siehe Tab. 5, 1 min.
4. Elongation	72 °C, 1 min. 30 sec.
5. Kühlung	4 °C, ohne zeitliche Begrenzung
Anzahl der Zyklen (d. h. Wiederholung der Schritte 2. - 4.): 35	

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zweck und Prinzip

Zur Kontrolle einer PCR und zur Auswertung eines Verdau wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. PCR- und Verdau-Produkte werden im Folgenden zusammenfassend als Reaktionsprodukte bezeichnet.

Die Reaktionsprodukte werden gemischt mit einem Auftragspuffer in die Slots eines starren Agarose-Gelblockes gegeben. Der Gelblock befindet sich in einer Elektrophoresekammer, die mit einem Puffer gefüllt ist. Dieser bedeckt den Gelblock komplett und schafft so eine das Gel mit einbeziehende elektrische Leitung zwischen Kammeranode und -kathode. Es wird eine Spannung an die Kammer angelegt, die bewirkt, dass die Reaktionsprodukte mit einer bestimmten Geschwindigkeit in einer bestimmten Richtung durch das Gel wandern: Je kleiner ein Molekül ist, umso schneller durchwandert es die Poren des Agarose-Gels; die Nettoladung des Moleküls bestimmt, ob es sich von der Anode zur Kathode oder in umgekehrter Richtung bewegt; DNA-Moleküle sind anionisch: Sie wandern zur Kathode.

Während PCR- und Verdau-Produkte farblos sind, enthält der Auftragspuffer einen Farbstoff, der es ermöglicht, die Wanderung der Reaktionsprodukte durch das Gel zu verfolgen und die Elektrophorese zu beenden, bevor die Reaktionsprodukte aus dem Gel austreten.

Nach beendeter Elektrophorese wird der Gelblock in ein Färbebad gegeben, das einen mit der DNA interkallierenden, unter UV-Bestrahlung fluoreszierenden Farbstoff enthält; dieser wird auf einem Transilluminator sichtbar gemacht - der Gelblock wird zu Dokumentationszwecken fotografiert.

Neben den Reaktionsprodukten wird in dem Gelblock stets ein so genannter DNA-Marker elektrophoretisch aufgetrennt; dieser Marker ist ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Länge. Der Vergleich der Banden der Reaktionsprodukte mit denen des Markers erlaubt es, die

Größe der in den Produkten enthaltenen DNA-Fragmente zu beurteilen und zu sehen, ob überhaupt Fragmente, Fragmente erwarteter oder solche unerwarteter Länge produziert wurden.

Detail

Herstellung des Agarose-Gelblockes: Agarose wurde in TBE- oder TAE-Puffer aufgelöst, so dass eine 2%ige Lösung entstand. Diese wurde in einer Mikrowelle erhitzt und so oft aufgeköcht, bis eine klare, homogene, schlierenfreie Flüssigkeit vorlag. Diese wurde auf einem Magnetrührer auf ca. 58 °C abgekühlt und zügig in eine Gelblock-Form gegossen, die Kämme für Slots der gewünschten Größe enthielt. Eventuell beim Gießen entstandene Luftblasen und Schlieren wurden sofort entfernt. Das erstarrte Gel wurde mit demselben Puffer begossen, aus dem es hergestellt worden war – TAE oder TBE.

Elektrophorese: 5 µl Reaktionsprodukt wurden mit 1 µl Auftragspuffer vermischt in je einen Slot gegeben; 4 µl DNA-Marker wurden ohne Auftragspuffer in einen Slot pro Gelblock gegeben. Je nach Größe der verwendeten Kammer wurde eine Spannung zwischen 90 V und 130 V angelegt. Die Dauer der Elektrophorese war abhängig von der angelegten Spannung, der Größe der kleinsten relevanten Fragmente und der Strecke, die diese maximal im Gel durchwandern sollten. Sie lag zwischen 30 min. und 2 h.

Färbung: In einer Dunkelkammer wurde das Gel für mindestens 25 min. und möglichst nicht länger als 2 h in einem Sybrgreenbad auf einen Rüttler getan. Das Sybrgreenbad bestand aus demselben Puffer, der bei der Herstellung des Gelblockes verwendet worden war (TAE oder TBE) sowie dem Farbstoff SYBR Green. Das Mengenverhältnis betrug 50 ml Puffer + 5 µl SYBR Green.

Auswertung: Der gefärbte Gelblock wurde auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 320 nm betrachtet und mit einer Polaroidkamera fotografiert.

3.4.4 Aufreinigung des PCR-Produktes

Zweck

Die Sequenzierung eines Abschnittes DNA erfolgt anhand von modifizierten Kopien und Teilkopien eines der beiden komplementären Stränge zu untersuchender DNA (modifizierte Teilkopien und Kopien werden in diesem Kapitel zusammenfassend Fragmente genannt). Die Verwendung von Fragmenten beider Stränge innerhalb eines Sequenzierungsansatzes führt zu unauswertbaren Ergebnissen. Hergestellt werden die Fragmente unter Verwendung von DNA-Abschnitts-Kopien und eines der beiden Primer – entweder des Vorwärts- oder des Rückwärtsprimers. Ein PCR-Produkt enthält neben den DNA-Abschnitts-Kopien allerdings

beide Primer – den Vorwärts- und den Rückwärtsprimer. Um das PCR-Produkt auf dem Weg zur Sequenzierung weiterverwenden zu können, müssen alle Primer einer Richtung – oder leichter – überhaupt alle Primer aus ihm entfernt werden. Diesen Vorgang nennt man Aufreinigung des PCR-Produktes.

Prinzip

Bindung

Das PCR-Produkt wird mit einem Puffer versetzt und vermischt, der dem Gemisch optimalerweise einen pH von $\leq 7,5$ geben sollte und chaotropische Salze in hoher Konzentration enthält. Die Mischung aus PCR-Produkt und Puffer wird auf die Silikon-Membran einer Zentrifugationssäule gegeben. Die chaotropischen Salze führen zu einer Denaturierung der DNA, die bei einem pH von $\leq 7,5$ in optimaler Menge an der Silikon-Membran adsorbiert.

Waschung und Trocknung

In einem ersten Zentrifugationsschritt wird ein Teil von Puffer und nicht-adsorbiertem PCR-Produkt aus der Silikon-Membran herauszentrifugiert. Anschließend wird ein ethanolhaltiger Waschpuffer auf die Membran gegeben und die Säule erneut zentrifugiert, wobei idealerweise alle Bestandteile des PCR-Produktes mit Ausnahme der an der Membran adsorbierten DNA aus der Membran herausgewaschen werden. Das Ethanol im Waschpuffer dient insbesondere dem Entfernen der chaotropischen Salze aus dem Bindungspuffer. In der Membran verbliebene Reste des Waschpuffers wiederum werden in einem folgenden Zentrifugationsschritt, der auch als Trocknung bezeichnet wird, aus der Membran entfernt.

Elution

Der Bindung, Waschung und Trocknung folgt als letzter Schritt die Elution: Ein Elutionspuffer wird auf die Silikon-Membran gegeben; es folgen eine mindestens einminütige Inkubation und ein letzter Zentrifugationsschritt. Während der Inkubation des Elutionspuffers in der Silikon-Membran wird die Adsorption der DNA an die Membran aufgehoben, die DNA löst sich im Elutionspuffer und wird schließlich zusammen mit ihm aus der Membran heraus in ein Auffanggefäß zentrifugiert. Der Elutionspuffer hat eine äußerst niedrige Salzkonzentration und idealerweise einen pH zwischen 7,0 und 8,5. Dies und eine ausreichend lange Inkubation sind die Voraussetzungen einer optimalen Elution.

Detail

Zur PCR-Aufreinigung verwendet wurde das QIAquick[®] PCR Purification Kit der Firma Qiagen.

Bindung: 45 μ l PCR-Produkt wurden mit 175 μ l PB Puffer versetzt, vermischt und mittig auf die Membran der Zentrifugationssäule gegeben.

Waschung und Trocknung: Die Säule wurde 1 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Auf die Säule wurden 750 µl PE Puffer gegeben, die daraufhin 1 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule noch einmal bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Elution: Auf die Membranmitte wurden 45 µl EB Puffer aufgetragen. Es folgten mindestens 1 min. Inkubation und eine Zentrifugation von 1 min. bei 13.000 rpm.

3.4.5 Kettenabbruch mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs

Zweck

Zur Sequenzierung eines bestimmten DNA-Abschnittes benötigt man Teilkopien dieses Abschnittes: Teilkopien, die ein Nukleotid nach dem Primer abbrechen, solche, die zwei Nukleotide später abbrechen, drei Nukleotide später - vier, fünf, sechs, sieben, acht, Nukleotide später usw. - bis hin zu kompletten Kopien des zu sequenzierenden Abschnittes. Jede mit dem Primer beginnende mögliche Teilkopie der gesuchten Sequenz muss vorliegen, um zu einem auswertbaren Ergebnis gelangen zu können. Dabei dürfen nur Kopien eines der beiden komplementären DNA-Stränge verwendet werden. Ob es sich um Kopien des sense-Stranges oder des antisense-Stranges handelt, ist im Prinzip gleichgültig.

Eine entscheidende Besonderheit der Teilkopien liegt in ihrem jeweils letzten Nukleotid. Dieses ist fluoreszenzmarkiert und wird als Farbterminator bezeichnet. Entsprechend den vier verschiedenen in der DNA vertretenen Nukleotiden werden vier verschiedene Farbterminatoren verwendet, die mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.

Im Sequenziergerät diffundieren die Teilkopien der Größe nach durch ein Polymer, an dem eine Spannung anliegt: die kleinsten Teilkopien zuerst, die größten zuletzt. Das Polymer befindet sich in einer Kapillare, an der an einer Stelle ein Laser und eine Kamera angebracht sind. Der Laser regt den Fluoreszenzfarbstoff im gerade passierenden Farbterminator zur Emission seines spezifischen Lichtes an; die Kamera registriert dieses Licht. Aus den den vier Farbterminatoren zugeordneten vier unterschiedlichen Wellenlängen erstellt eine Software ein so genanntes Elektropherogramm. Das Elektropherogramm bildet die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnittes ab.

Prinzip

Die Herstellung der beim Sequenzieren verwendeten fluoreszenzmarkierten Teilkopien ähnelt einer PCR und wird im Folgenden beschrieben.

Es wird ein Reaktionsansatz erstellt, der folgendes enthält:

- aufgereinigtes PCR-Produkt,
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs),
- vier verschiedene Farbterminatoren (fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxynukleosidtriphosphate = fluoreszenzmarkierte ddNTPs),
- Taq-Polymerase,
- entweder den Vorwärts- oder den Rückwärtsprimer und
- weitere Zusätze, die eine optimale Reaktionsumgebung garantieren sollen (eine thermostabile Pyrophosphatase, MgCl₂, Tris-HCl-Puffer (pH 9,0)).

Zuerst werden die PCR-Produkte bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf eine primerspezifische Annealing-Temperatur kommt es zu einer Bindung der Primer an die jetzt einzeln vorliegenden sense- oder antisense-Stränge. Bei einer enzymespezifischen Elongations-Temperatur erfolgt an den DNA-Primer-Hybriden eine Strangsynthese bei der am 3'-Ende des Primers ein zur DNA komplementärer Strang entsteht: Die Taq-Polymerase bindet an die 3'-Hydroxylenden der Primer entweder ein dNTP oder ein ddNTP. Wurde ein dNTP eingebaut, so kann die Strangsynthese am 3'-Ende dieses dNTPs fortgesetzt werden. Wurde ein ddNTP eingebaut, bricht die Strangsynthese ab, da dem ddNTP das 3'-Hydroxylende zur Anbindung weiterer Nukleotide fehlt.

Bei der Kettenabbruchsreaktion werden statt dGTPs dITPs verwendet. Diese sollen ein als Kompression bezeichnetes Phänomen vermeiden bzw. vermindern:

Einzelsträngige DNA-Moleküle haben die Neigung, Schlaufen zu bilden, indem in ihnen zueinander komplementäre Bereiche hybridisieren. G-C-Hybride sind besonders stabil. Die im Sequenziererpolymer stattfindende elektrophoretische Auftrennung einsträngiger DNA-Moleküle wird verfälscht, wenn einige von ihnen als Strang, andere als Schlaufe laufen: Die Schlaufen sind weniger mobil. Im Unterschied zum dGTP-dCTP-Hybrid ist das dITP-dCTP-Hybrid weit weniger stabil. Es kommt gar nicht oder seltener zur Schlaufenbildung. Die DNA-Moleküle besitzen eine normale elektrophoretische Mobilität (123-125).

Der Reaktionsansatz enthält eine thermostabile Pyrophosphatase, um das Pyrophosphat zu zerstören, das seinerseits die Produkte der Kettenabbruchsreaktion lysiert und ein besonderes Problem bei der Verwendung von dITP darstellt (126).

Detail

Zur Durchführung der Kettenabbruchsreaktion wurde das BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Thermocycler-Programm und Reaktionsansätze sind im Folgenden beschrieben.

Reaktionsansatz 1

HPLC-H ₂ O	5,8 µl
Terminator Ready Reaction Mix	2,0 µl
Primer (entweder Vorwärts oder Rückwärts)	0,2 µl
PCR-Produkt	2,0 µl

Reaktionsansatz 2

HPLC-H ₂ O	5,8 µl
Terminator Ready Reaction Mix	2,0 µl
Primer (entweder Vorwärts oder Rückwärts)	0,1 µl
PCR-Produkt	2,0 µl

Bestandteile des Terminator Ready Reaction Mix:

- A-, C-, G- und T-Farbterminatoren
- dNTPs (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- AmpliTaq® Polymerase FS mit thermostabiler Pyrophosphatase
- MgCl₂, Tris-HCl-Puffer (pH 9,0)

Thermocycler-Programm

1. Vor der Denaturierung	95 °C, 30 sec.
2. Denaturierung	95 °C, 30 sec.
3. Annealing	Temperatur siehe Tab. 6, 30 sec.
4. Elongation	55 °C, 4 min.
5. Kühlung	4 °C, ohne zeitliche Begrenzung

Tab. 6: Bei Kettenabbruchsreaktionen verwendete aufgereinigte PCR-Produkte, Primer, Reaktionsansätze und Annealing-Temperaturen; die Primer sind vom 5'- zum 3'-Ende notiert.

Verwendetes aufgereinigtes PCR-Produkt	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Reaktionsansatz	Annealing-Temperatur
Slc11a3 Exon 1	ccccgactcgggataagagc	agagccacattcctccagaa	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 1A	agtcggaggtcgcagggga	gctctcgcctgaggtgcttgt	Nr. 2	64 °C
Slc11a3 Exon 1B	ccgcttcataaggctttgc	agcagagccacattcctcca	Nr. 2	63,5 °C
Slc11a3 Exon 2	cgtggtttgtcctgcaaagt	tcatggggaaagatcttgat	Nr. 1	60 °C
Slc11a3 Exon 3	catctgagcagtattcaatctaagag	tcctagttgttgttcctttgc	Nr. 2	60 °C
Slc11a3 Exon 4	ggtgtgatcctctgggttgt	agctcaagcattttcatcc	Nr. 2	60 °C
Slc11a3 Exon 5	ggttaggacattatgccattg	cctcattatcaccaccgatt	Nr. 2	60 °C
Slc11a3 Exon 6	agtgggacttgacccaaaca	tcttccaacatttaaggtctga	Nr. 2	60 °C
Slc11a3 Exon 7A	ccttgctggaattcttagat	cgacgtagccaagtaaagc	Nr. 2	58 °C
Slc11a3 Exon 7B	ggactgagtgggtccatcct	catttagggaacatttcagatca	Nr. 2	58 °C
Slc11a3 Exon 8	tgtgatttgaaatgtatgcctgta	acaccagccattttattgga	Nr. 2	60 °C

3.4.6 Aufreinigung des Kettenabbruch-Produktes

Zweck

Das Kettenabbruch-Produkt ist nicht direkt für die Sequenzierung verwendbar. Die überschüssigen, während der Reaktion nicht in DNA-Kopien eingebauten Farbterminatoren hätten im Sequenziererpolymer eine ähnliche Mobilität wie die fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle. Sie würden das beim Sequenzieren entstehende Elektropherogramm verfälschen und müssen deshalb zuerst entfernt werden (123). Dieser Arbeitsschritt wird als Aufreinigung des Kettenabbruch-Produktes bezeichnet.

Prinzip

Das Kettenabbruch-Produkt wird auf eine Gelchromatographie-Säule aufgetragen, die sich in einem Auffanggefäß befindet. Säule und Gefäß werden zentrifugiert. Die schweren fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente passieren das Gel, die wesentlich leichteren Farbterminatoren verbleiben im Gel (127).

Detail

Zur Aufreinigung des Kettenabbruch-Produktes wurde das DyeExTM 2.0 Spin Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die darin enthaltene Filtrationssäule wurde gevortext, um das in Lösung befindliche Gel gleichmäßig in der Lösung zu verteilen. Der Deckel der Filtrationssäule wurde gelockert, das untere Ende abgebrochen; anschließend wurde die Säule 3 min. lang mit 3.100 rpm zentrifugiert, in ein neues Auffanggefäß gestellt und der Deckel entfernt. Langsam wurden 10 µl des Kettenabbruch-Produktes mittig auf die Säule gegeben, ohne diese zu berühren. Die Säule wurde erneut 3 min. lang mit 3.100 rpm zentrifugiert. Im Auffanggefäß befanden sich nun ca. 5 µl Kettenabbruch-Produkt - ohne überschüssige Farbterminatoren (127).

3.4.7 Denaturierung des Kettenabbruch-Produktes

Damit die Kettenabbruch-Produkte ihrer Größe nach durch das Polymer des Sequenziergerätes diffundieren können, müssen sie zuerst durch Denaturierung vom PCR-Produkt gelöst werden. Die Denaturierung wurde folgendermaßen bewirkt:

5 µl Kettenabbruch-Produkt wurden mit 20 µl Template Suppression Reagenz (TSR) versetzt und 2 min. lang bei 90 °C inkubiert. Der nun vorliegende Ansatz konnte in das Sequenziergerät gestellt werden.

Zum Sequenzieren verwendet wurde ein Gerät des Typs ABI Prism 310.

3.4.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)

Zweck

Ob bei bestimmten Patienten bereits bekannte oder durch das Sequenzieren neu entdeckte Polymorphismen homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegen, lässt sich z. T. durch die elektrophoretische Sichtbarmachung von RFLP ermitteln.

Prinzip

DNA-Fragmente von Patienten, die einen Polymorphismus homozygot, heterozygot bzw. gar nicht aufweisen, werden einem so genannten Restriktionsenzym ausgesetzt. Dieses bakterielle Enzym schneidet doppelsträngig DNA, wenn eine bestimmte Sequenz vorliegt – die so genannte Erkennungssequenz. Die Stelle, an der das Enzym die beiden Stränge schneidet, befindet sich meistens innerhalb der Erkennungssequenz und wird als Restriktionsschnittstelle bezeichnet; der Vorgang des Schneidens heißt Verdau.

Zwei Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um einen Polymorphismus mittels RFLP nachweisen zu können:

1. Das Vorliegen des Polymorphismus muss das Vorliegen einer Erkennungssequenz bedingen.
2. Durch die Wahl entsprechender Primer muss es möglich sein, die Restriktionsschnittstelle so

im DNA-Fragment zu positionieren, dass der Verdau Fragmentkombinationen produziert, die nach elektrophoretischer Auftrennung eine Unterscheidung von Homozygotie, Heterozygotie und Wildtyp erlauben.

Die Restriktionsenzyme (auch Restriktionsendonukleasen genannt) wurden Ende der sechziger Jahre von Werner Arber, Hamilton Smith und Daniel Nathans entdeckt .

Detail

Mittels einer speziellen Software wurde ermittelt, ob für die nachzuweisenden Polymorphismen Restriktionsenzyme existierten und ob es möglich war, durch entsprechende Primerwahl auswertbare RFLPs zu erzeugen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze empirisch optimiert.

Alle Verdaue erfolgten bei 37 °C über eine Dauer von 16 h und 40 min. in einem Thermocycler.

Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Reaktionsansatz 1

Enzym (BfaI)	1,6 µl
NEBuffer 4	1,5 µl
HPLC-H ₂ O	6,7 µl
PCR-Produkt	6,0 µl

Reaktionsansatz 2

Enzym (HpyCH4IV)	0,8 µl
NEBuffer 1	1,5 µl
HPLC-H ₂ O	6,7 µl
PCR-Produkt	6,0 µl

Reaktionsansatz 3

Enzym (XmnI)	0,8 µl
NEBuffer 2	1,5 µl
purified BSA	0,25 µl
HPLC-H ₂ O	6,45 µl
PCR-Produkt	1,0 µl

Reaktionsansatz 4

Enzym (RsaI)	0,3 µl
NEBuffer 1	1,5 µl
HPLC-H ₂ O	7,2 µl
PCR-Produkt	6,0 µl

Reaktionsansatz 5

Enzym (MboI)	0,5 µl
NEBuffer 3	1,5 µl
HPLC-H ₂ O	7,0 µl
PCR-Produkt	6,0 µl

Tab. 7: In Verdauen verwendete PCR-Produkte, deren Größen, die Größen der entstandenen Fragmente (in Klammern befindliche Fragmentgrößen waren zu klein, um durch elektrophoretische Auftrennung sichtbar zu werden), verwendete Reaktionsansätze und Enzyme.

Verdautes PCR-Produkt	Größe des PCR-Produktes	Größe der Verdaufragmente [Bp]	Reaktionsansatz	Enzym
Slc11a3 Exon 1B	392 Bp	wt: 247+145 he: 392+247+145	Nr. 1	BfaI
Slc11a3 Exon 5	395 Bp	wt: 340 (+55) he: 395+340 (+55)	Nr. 2	HpyCH4IV
PM8 PCR2	185 Bp	wt: 164 (+21) he: 185+164 (+21)	Nr. 3	XmnI
HFE C282Y	387 Bp	wt: 247+140 he: 247+140+111 (+29) ho: 247+111 (+29)	Nr. 4	RsaI
HFE H63D	208 Bp	wt: 138+70 he: 208+138 (+70) ho: 208	Nr. 5	MboI

3.4.9 Einbau künstlicher Restriktionsschnittstellen

Zweck

Substrat für jeden Verdau ist ein PCR-Produkt. Dieses PCR-Produkt muss eine Erkennungssequenz enthalten, deren Vorhandensein vom Vorhandensein des gesuchten Polymorphismus abhängt. Liegt eine derartige Erkennungssequenz nicht vor, so kann sie u. U. künstlich erzeugt werden; dies wird als Einbau einer künstlichen Restriktionsstelle bezeichnet.

Prinzip

Im Anschluss an eine erste PCR wird mit modifizierten Primern eine zweite PCR durchgeführt; Substrat der zweiten PCR ist das Produkt der ersten. Die letzte, vorletzte oder vorvorletzte Base

der veränderten Primer ist nicht komplementär zur Matrizen-Sequenz der ersten PCR. Die abweichende Base wird so gewählt, dass ihr Einbau nur dann eine Erkennungssequenz schafft, wenn der nachzuweisende Polymorphismus vorliegt - oder nicht.

Detail

Zum Nachweis mittels RFLP war nur bei dem Polymorphismus PM8 der Einbau einer künstlichen Restriktionsschnittstelle nötig. Er erfolgte mit der „PM8 PCR2“ genannten PCR, die in Tabelle 5 beschrieben ist.

3.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurden die aussagekräftigsten, verfügbaren Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg identifiziert. Anschließend wurden Mehrfeldertafeln erstellt, in denen die Ausprägungen der Surrogatparameter den Spalten, die Manifestationen der Polymorphismen den Zeilen zugeordnet wurden; nach Betrachtung der Mehrfeldertafeln wurde entschieden, auf welche Korrelationen zwischen Polymorphismen und Therapie-Erfolgs-Surrogatparametern hin statistisch getestet werden – und mit welchen Verfahren dies geschehen sollte.

Sowohl zum Erstellen der Mehrfeldertafeln als auch zum statistischen Testen wurde das Computer-Programm „SPSS“ (Version 15.0.1) verwendet. Gewählter statistischer Test war der Exakte Test nach Fisher. Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Niveau von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Angesichts des hypothesengenerierenden Charakters der Arbeit wurde trotz der Multiplizität des Testens auf eine Adjustierung des Signifikanzniveaus verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse

Im ersten Arbeitsschritt wurden die 5'-UTR, die 3'-UTR, alle acht Exone und an die Exone angrenzende Teile der Introne des Ferroportin-Gens sequenziert. Analysiert wurde die DNA von 50 CHC-Patienten und 15 gesunden Probanden. Es wurden insgesamt 11 Polymorphismen-Loci identifiziert (siehe Tab. 8, Abb. 4-14). Drei dieser Loci befinden sich in der 5'-UTR, einer in der 3'-UTR, einer im Bereich kodierender DNA, die restlichen sechs Loci sind intronisch; die Erscheinungsformen des exonischen Polymorphismus bewirken keinen Aminosäureaustausch. Der exonische, alle intronischen, der 3'-UTR- und zwei der 5'-UTR-Polymorphismen sind so genannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Bei dem dritten 5'-UTR-Polymorphismus handelt es sich um eine Insertion bzw. Deletion von drei Basenpaaren (CGG) innerhalb eines Repeats.

Tab. 8: Bei der Sequenzanalyse des Ferroportin-Gens identifizierte Polymorphismen

Abkürzung	Polymorphismus	Häufigkeit 1	Häufigkeit 2	Rs-Nummer
PM 1	c.1-310 CGG(7)	51	25	rs16836041
	c.1-310 CGG(8)	78	52	
	c.1-310 CGG(9)	1	1	
PM 2	c.1-98 G>C	34	27	rs13008848
PM 3	c.1-8 C>G	35	28	rs11568351
PM 4	IVS1+68 A>C	52 *	26 *	rs4287798
PM 5	IVS1-24 G>C	111	64	rs1439816
PM 6	IVS2+147 A>G	34	27	rs1123109
PM 7	IVS4-141 G>A	4	4	Erstbeschreibung
PM 8	c.663 T>C	83	55	rs2304704
PM 9	IVS6+14 A>G	1	1	Erstbeschreibung
PM 10	IVS7+55 G>A	1	1	Erstbeschreibung
PM 11	IVS8+202 G>A	1 **	1 **	Erstbeschreibung

Häufigkeit 1: Anzahl der Allele, die den Polymorphismus aufweisen (von insgesamt 130 Allelen)

Häufigkeit 2: Anzahl der Probanden, die den Polymorphismus aufweisen (von insgesamt 65)

* die Ausprägung dieses Polymorphismus konnte nur bei 41 von 65 Probanden eindeutig bestimmt werden

** die Ausprägung dieses Polymorphismus konnte nur bei 45 von 65 Probanden eindeutig bestimmt werden

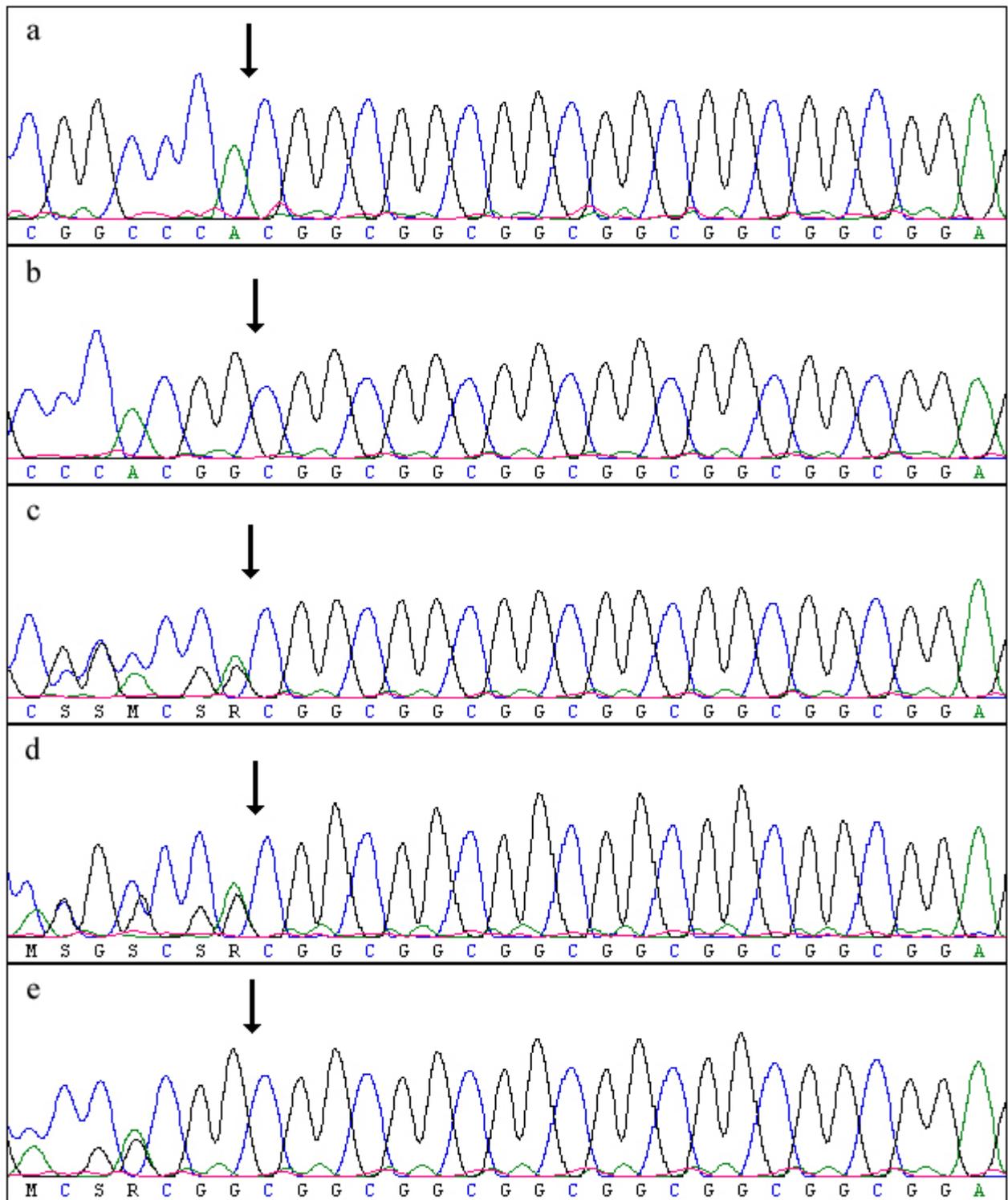


Abb. 4: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 1.

Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition c.1-330_331. Unterschiede zwischen den Ausprägungen von c.1-310 CGG(7_9) sind links des schwarzen Pfeils zu sehen, da Rückwärtsprimer verwendet wurden. Position c.1-310 ist die zweite Base vom rechten Bildrand aus gesehen.

- a: (CGG)₇₇
- b: (CGG)₈₈
- c: (CGG)₇₈
- d: (CGG)₇₉
- e: (CGG)₈₉

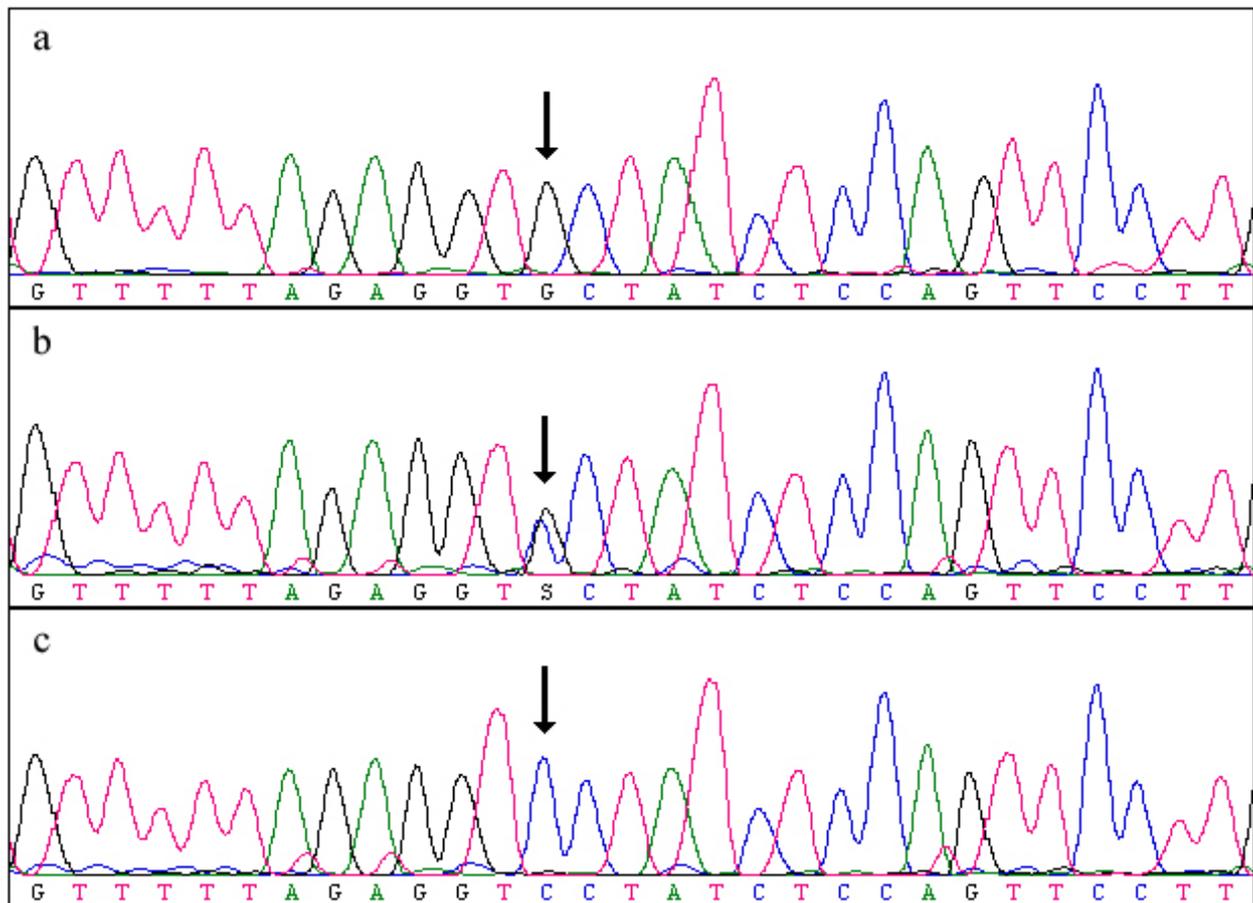


Abb. 5: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 2.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition c.1-98.
 a: Wildtyp
 b: G>C he
 c: G>C ho

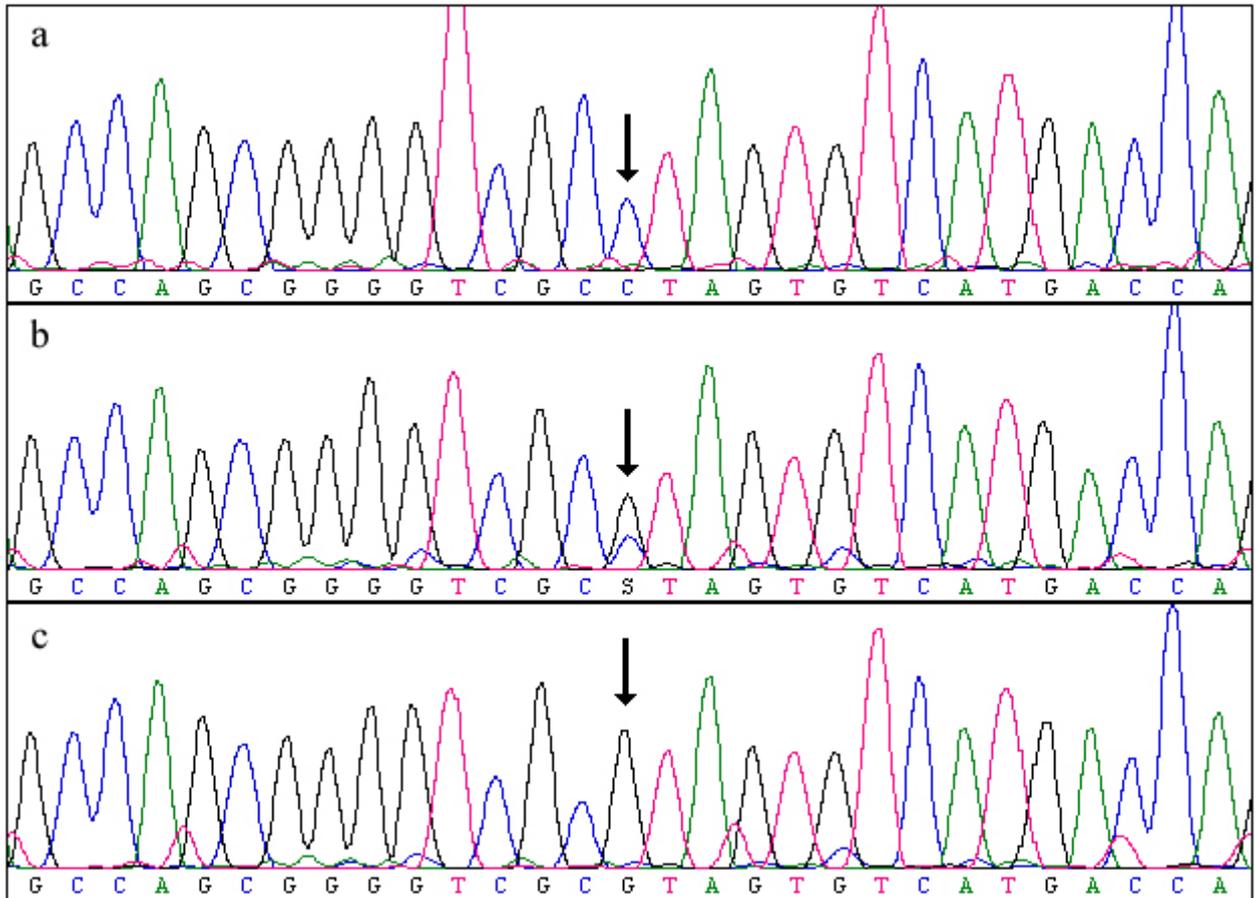


Abb. 6: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 3.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition c.1-8.
 a: Wildtyp
 b: C>G he
 c: C>G ho

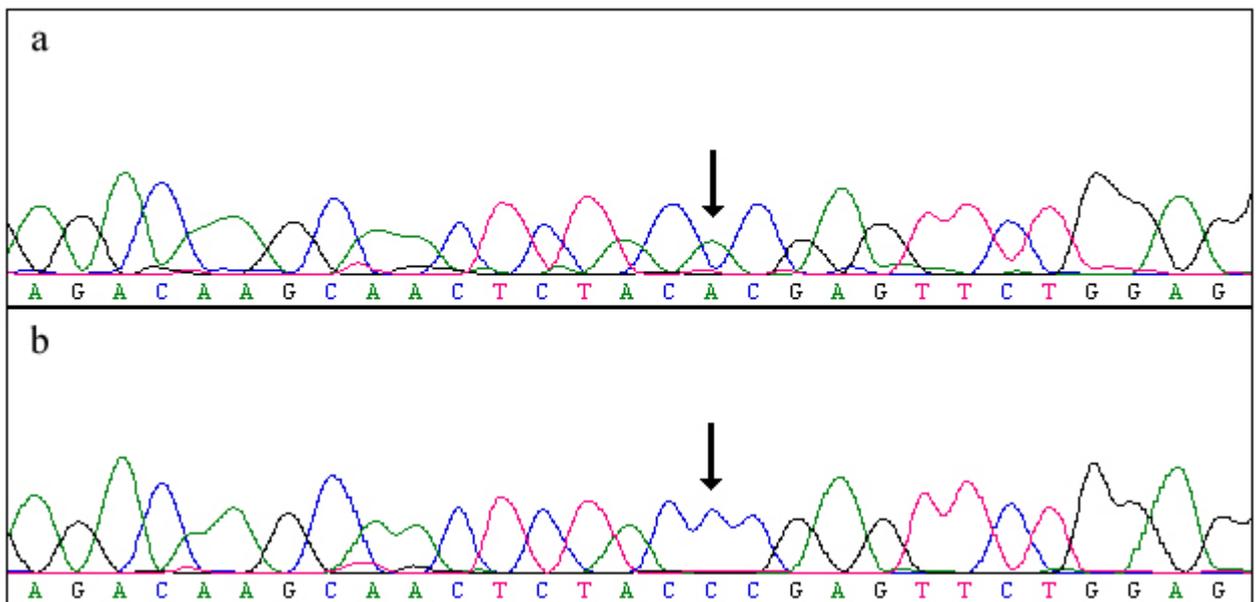


Abb. 7: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 4.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS1+68.
 a: Wildtyp
 b: A>C ho

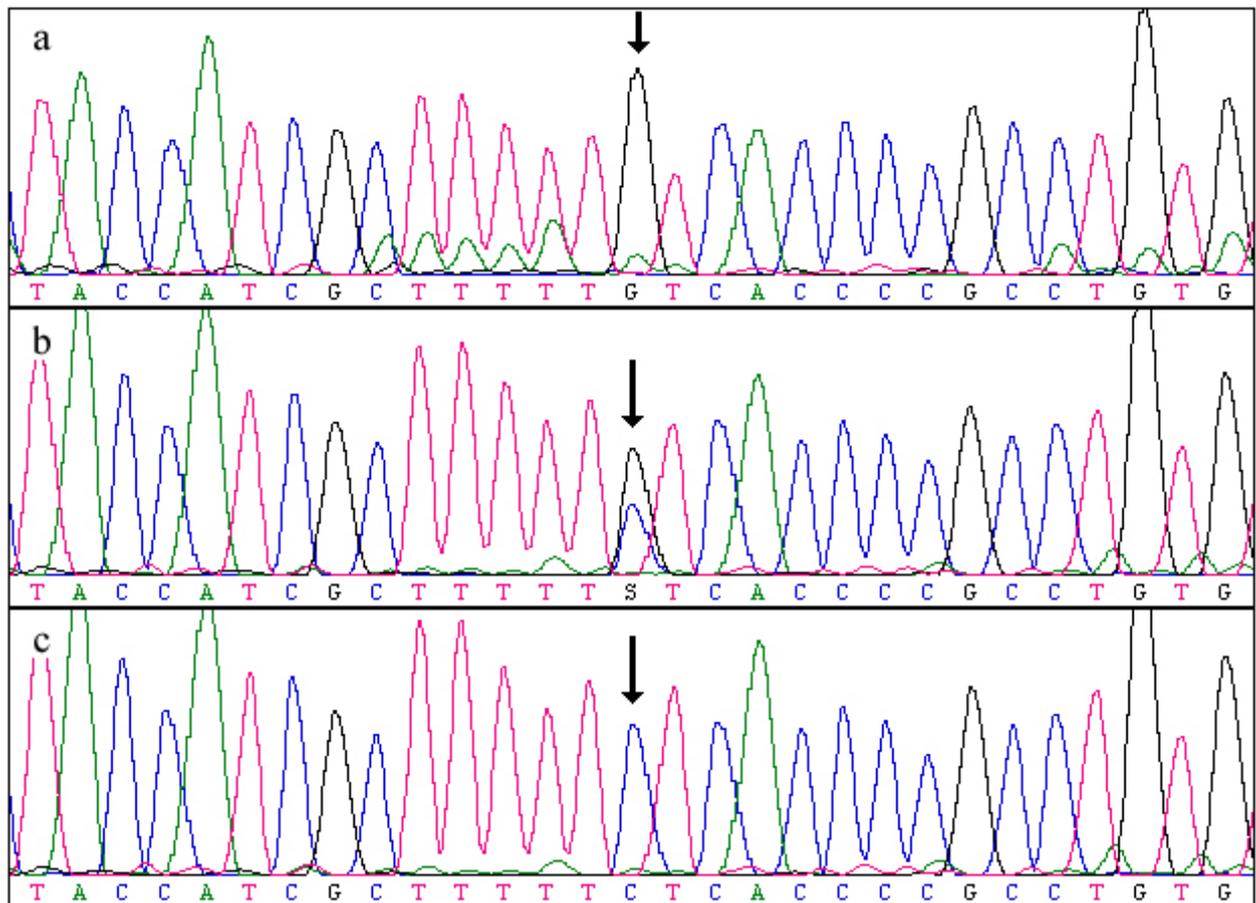


Abb. 8: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 5.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS1-24.
 a: Wildtyp
 b: G>C he
 c: G>C ho

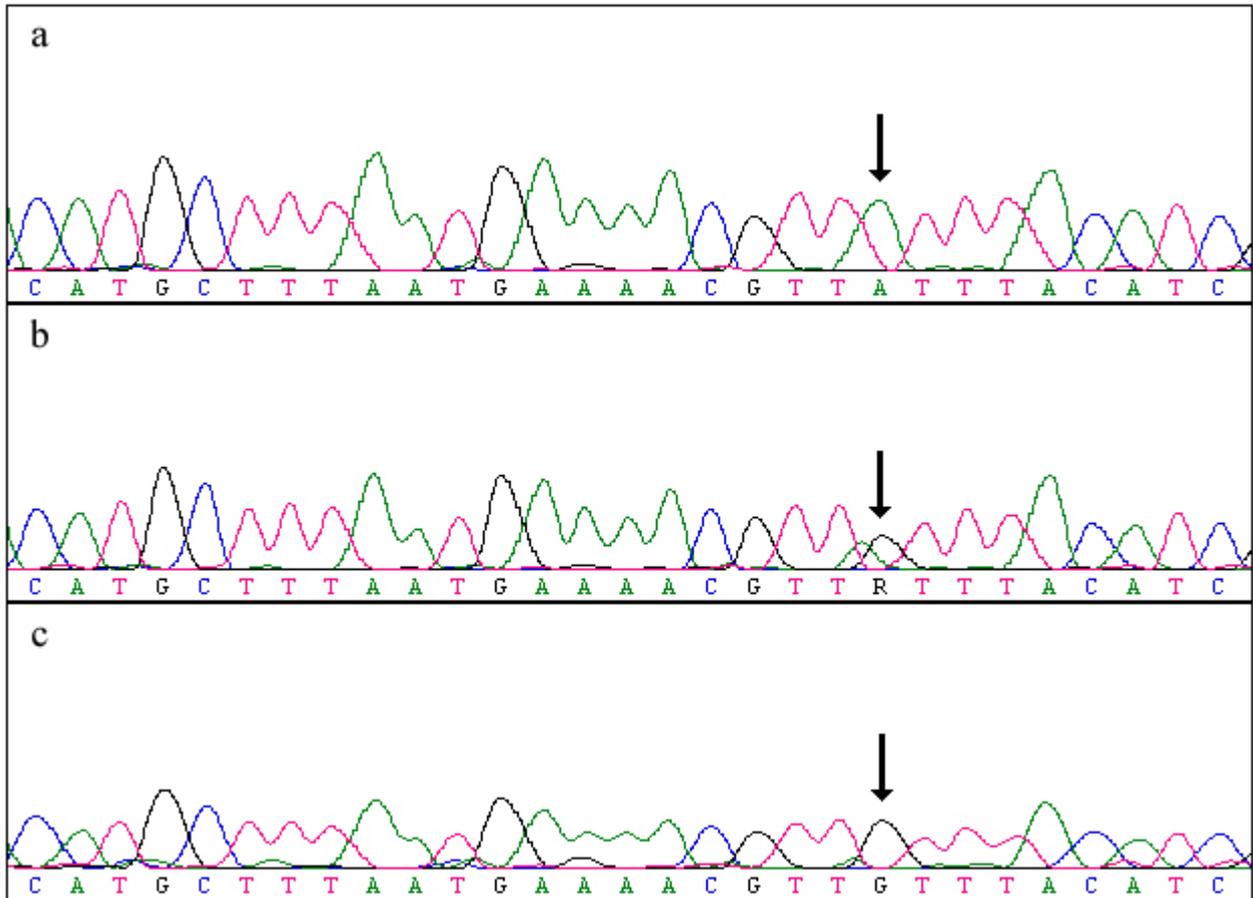


Abb. 9: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 6.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS2+147.
 a: Wildtyp
 b: A>G he
 c: A>G ho

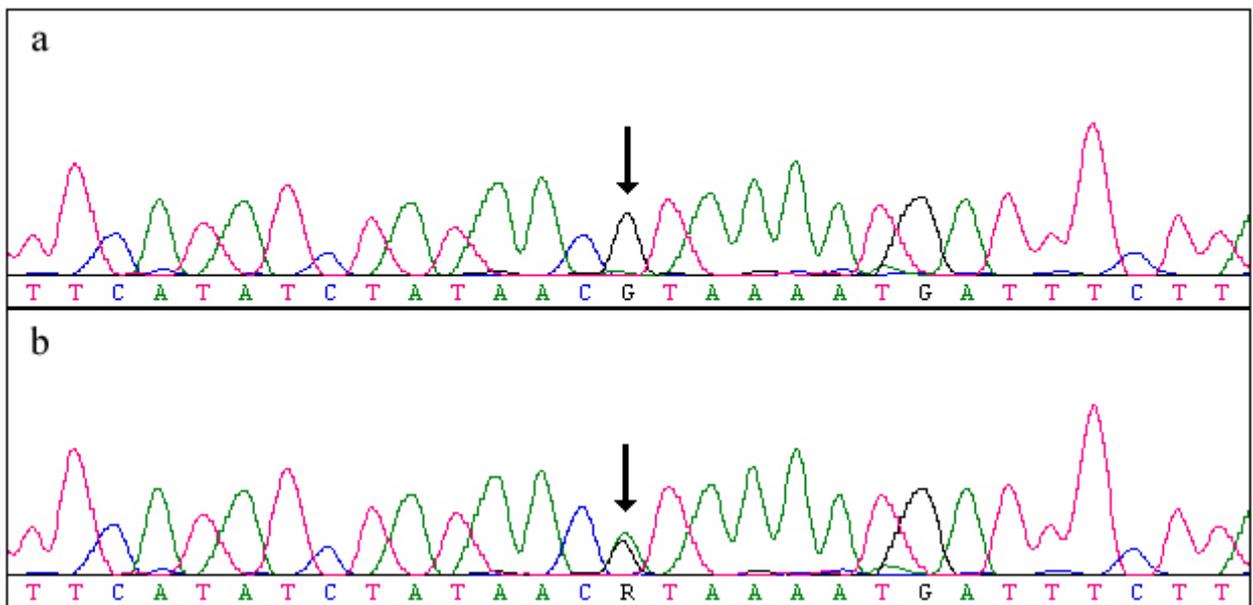


Abb. 10: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 7.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS4-141.
 a: Wildtyp
 b: G>A he

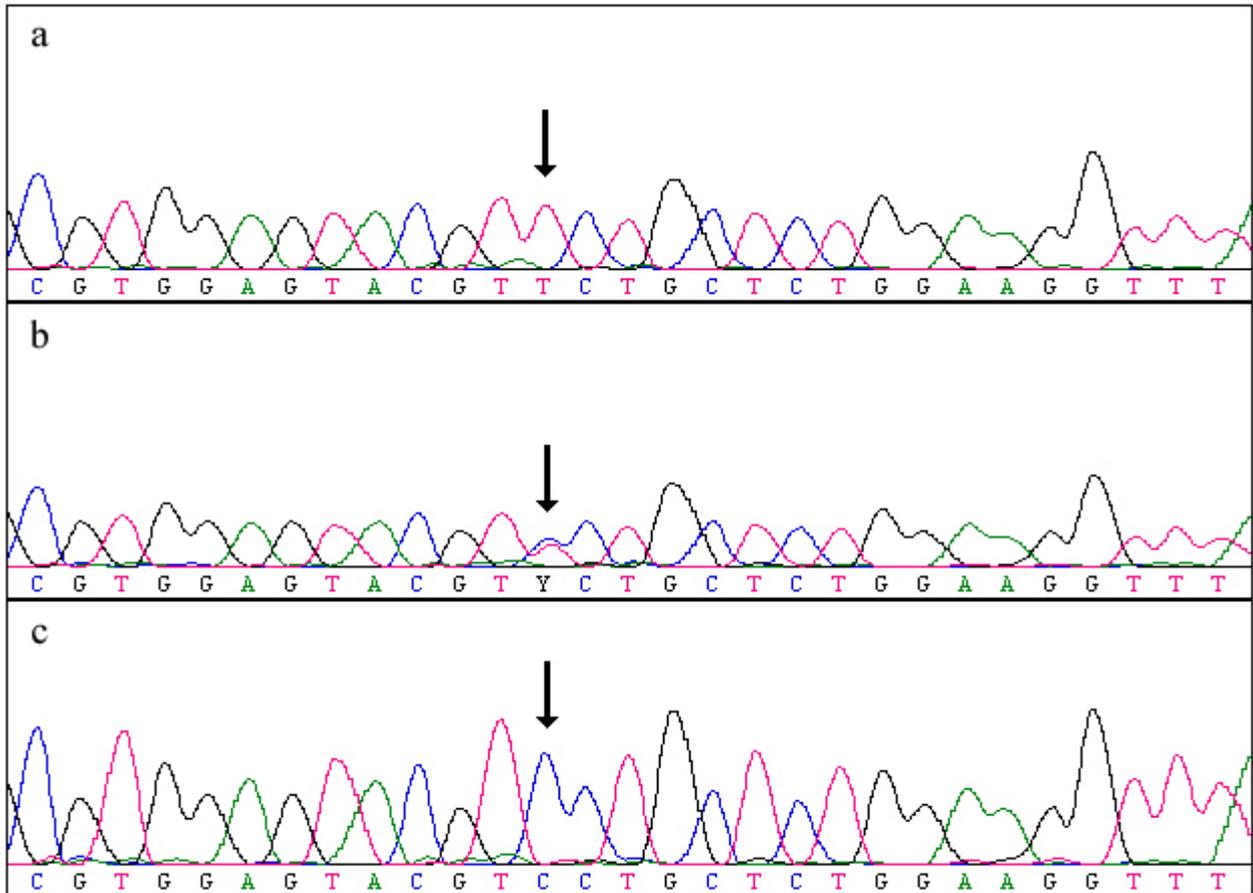


Abb. 11: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 8.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition c.663.
 a: Wildtyp
 b: T>C he
 c: T>C ho

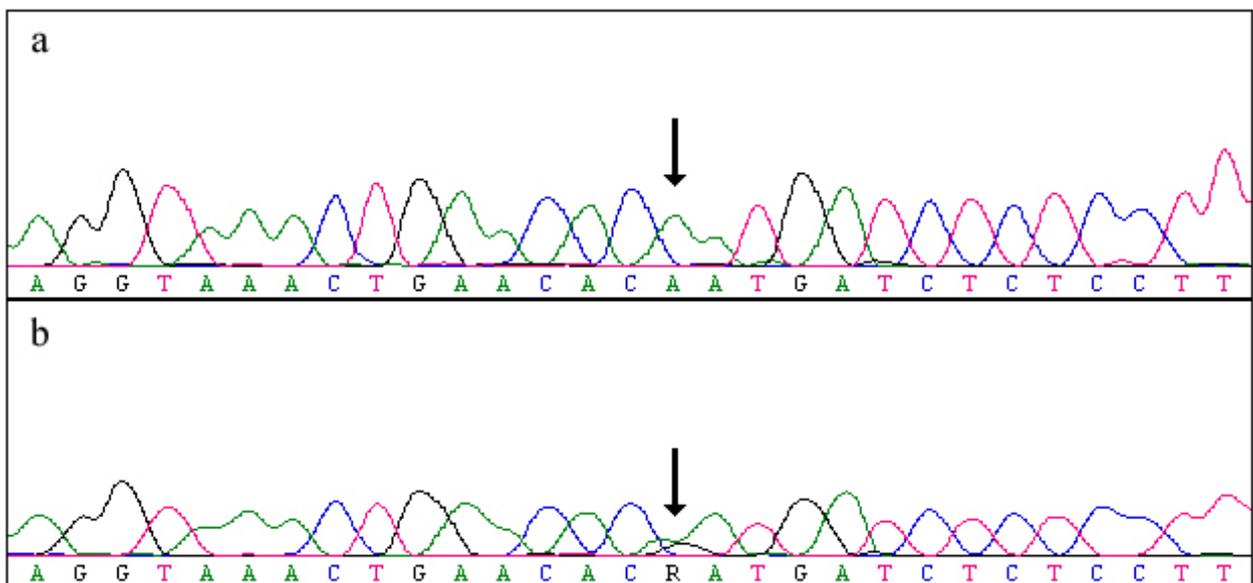


Abb. 12: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 9.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS6+14.
 a: Wildtyp
 b: A>G he

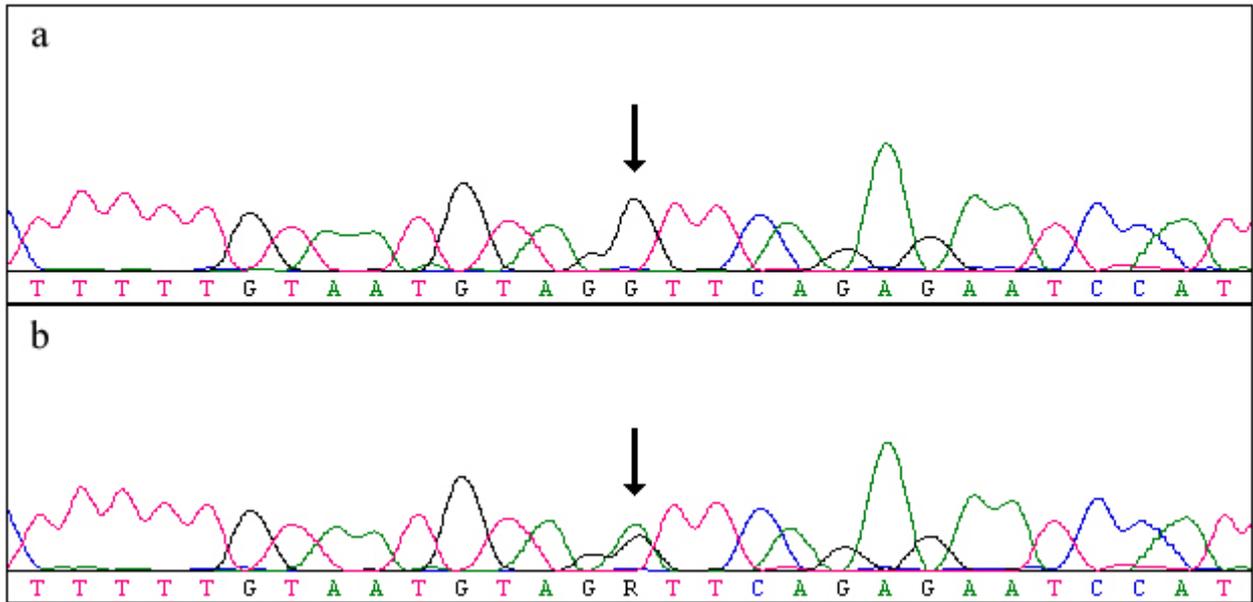


Abb. 13: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 10.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS7+55.
 a: Wildtyp
 b: G>A he

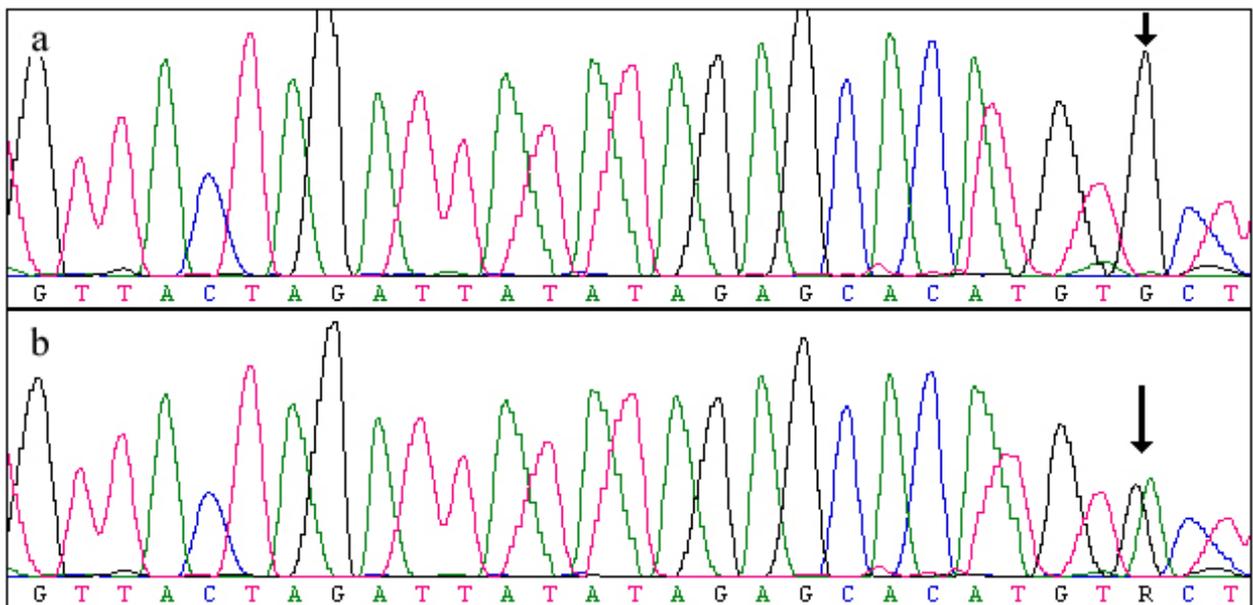


Abb. 14: Elektropherogramme des Polymorphismus PM 11.
 Der schwarze Pfeil markiert die Nukleotidposition IVS8+202.
 a: Wildtyp
 b: G>A he

4.2 Haplotypenanalyse

Die oben aufgelisteten elf Polymorphismen-Loci (siehe Tab. 8) wurden im Anschluss an ihre Identifizierung einer so genannten Haplotypenanalyse unterzogen. Ziel dieser Analyse war es, die Polymorphismen zu identifizieren, auf die hin eine zweite Probandengruppe gescreent werden sollte.

Die Analyse verlief wie folgt: Für jeden der 65 Probanden wurde ein bi-chromosomaler Haplotyp festgestellt – bestehend aus den bi-chromosomalen Manifestationen der einzelnen Polymorphismen (d. h. wt, he, ho, etc.). Anschließend wurde geprüft, ob sich die bi-chromosomalen auf mono-chromosomale Haplotypen zurückführen ließen. Zuletzt wurden die Polymorphismen identifiziert, durch die sich die mono-chromosomalen Haplotypen voneinander unterscheiden. Nur auf diese Polymorphismen hin wurde die zweite Patientengruppe gescreent.

Um mono-chromosomale Haplotypen zu identifizieren, wurden lediglich die bi-chromosomalen Haplotypen betrachtet, die höchstens einen heterozygoten Polymorphismus aufweisen und sich ansonsten ausschließlich aus Wildtypen bzw. homozygoten Polymorphismen zusammensetzen. Solche bi-chromosomalen Haplotypen können nur aus zwei identischen bzw. zwei sich lediglich an einem Locus unterscheidenden mono-chromosomalen Haplotypen bestehen. Die derart identifizierten mono-chromosomalen Haplotypen wurden anschließend in jeder theoretisch möglichen Weise miteinander kombiniert, um bi-chromosomale Haplotypen zu konstruieren und zu prüfen, wie viele der im Probandenkollektiv tatsächlich beobachteten bi-chromosomalen Haplotypen, die mehrere Heterozygotien zeigten, sich auf eine Kombination der bisher eindeutig festgestellten mono-chromosomalen Haplotypen zurückführen ließen.

Die Polymorphismen PM 4, 9, 10 und 11 wurden aus folgenden Gründen nicht in die Analyse mit einbezogen: PM 4 und 11 konnten nicht bei allen Patienten eindeutig bestimmt werden; PM 9, 10 und 11 wurden bei nur jeweils einem Patienten beobachtet (siehe Tab. 8). Die Betrachtung der verbleibenden Polymorphismen ergab 16 verschiedene bi-chromosomale Haplotypen: sieben wiesen mehr als eine Heterozygotie auf – neun maximal eine (siehe Tab. 9). Diese neun bi-chromosomalen Haplotypen ließen sich auf ebenfalls neun mono-chromosomale Haplotypen zurückführen (siehe Tab. 10). Auf diese neun mono-chromosomalen Haplotypen ließen sich auch all die bi-chromosomalen Haplotypen zurückführen, die mehr als eine Heterozygotie aufwiesen.

Nötig zur Unterscheidung der identifizierten mono-chromosomalen Haplotypen waren die Polymorphismen PM 1, 3, 7 und 8 sowie einer der drei Polymorphismen PM 2, 5 oder 6. PM 2 wurde gewählt, da er von seiner Lokalisation her am wahrscheinlichsten funktionell relevant erschien.

Tab. 9: bi-chromosomale Haplotypen

bi-chromosomaler Haplotyp	PM 1	PM 2	PM 3	PM 5	PM 6	PM 7	PM 8	Häufigkeit
1	(CGG) _{8/8}	wt	wt	ho	wt	wt	ho	19
2	(CGG) _{8/8}	wt	wt	ho	wt	wt	wt	4
3	(CGG) _{7/7}	ho	ho	ho	ho	wt	wt	3
4	(CGG) _{7/7}	ho	ho	ho	ho	wt	he	2
5	(CGG) _{8/8}	wt	wt	ho	wt	wt	he	2
6	(CGG) _{8/9}	wt	wt	ho	wt	wt	ho	1
7	(CGG) _{8/8}	ho	ho	ho	ho	wt	wt	1
8	(CGG) _{7/7}	ho	ho	ho	ho	he	wt	1
9	(CGG) _{7/7}	wt	he	wt	wt	wt	ho	1
10	(CGG) _{7/8}	he	he	ho	he	wt	he	12
11	(CGG) _{7/8}	wt	wt	he	wt	wt	ho	7
12	(CGG) _{7/8}	wt	wt	he	wt	wt	he	4
13	(CGG) _{7/7}	he	he	he	he	wt	he	4
14	(CGG) _{7/7}	he	he	he	he	he	he	2
15	(CGG) _{7/8}	he	he	ho	he	wt	wt	1
16	(CGG) _{7/8}	he	he	ho	he	he	he	1

Häufigkeit: absolutes Auftreten bei 65 Probanden

maximal eine Heterozygotie

mehr als eine Heterozygotie

Tab. 10: mono-chromosomale Haplotypen, auf die sich die bi-chromosomalen Haplotypen zurückführen lassen

Mono-chromosomaler Haplotyp	PM 1	PM 2	PM 3	PM 5	PM 6	PM 7	PM 8
A	(CGG) ₈	0	0	1	0	0	1
B	(CGG) ₈	0	0	1	0	0	0
C	(CGG) ₇	1	1	1	1	0	0
D	(CGG) ₇	1	1	1	1	0	1
E	(CGG) ₈	1	1	1	1	0	0
F	(CGG) ₇	0	0	0	0	0	1
G	(CGG) ₇	1	1	1	1	1	0
H	(CGG) ₇	0	1	0	0	0	1
I	(CGG) ₉	0	0	1	0	0	1

0: Polymorphismus liegt nicht vor

1: Polymorphismus liegt vor

4.3 Polymorphismenscreening

Die Polymorphismen PM 1 und 2 wurden in der zweiten Probandengruppe mittels Sequenzanalyse bestimmt. Das Vorliegen von PM 3, 7 und 8 sowie HFE H63D und C282Y wurde über die Agarose-Gelelektrophorese von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen sichtbar gemacht. Folgende Abbildungen sind Beispiele der elektrophoretischen Nachweise:

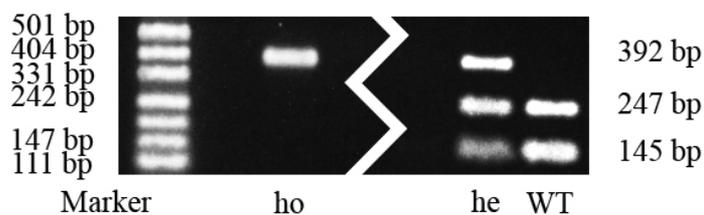


Abb. 15: Agarose-Gelelektrophorese des Polymorphismus PM 3

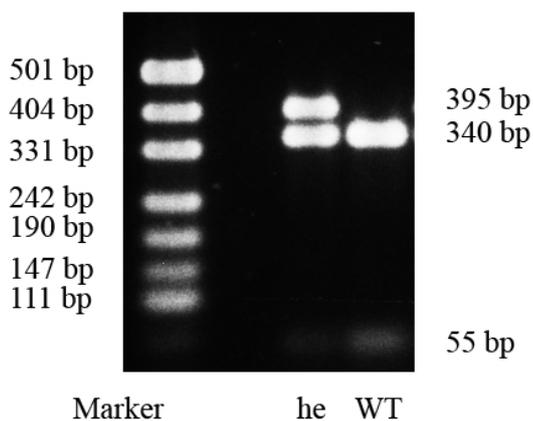


Abb. 16: Agarose-Gelelektrophorese des Polymorphismus PM 7

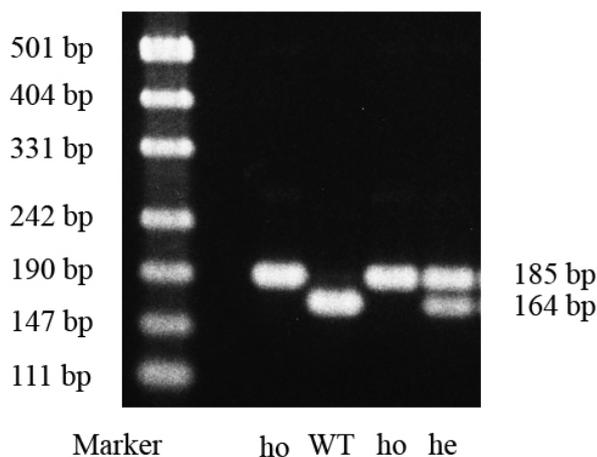


Abb. 17: Agarose-Gelelektrophorese des Polymorphismus PM 8

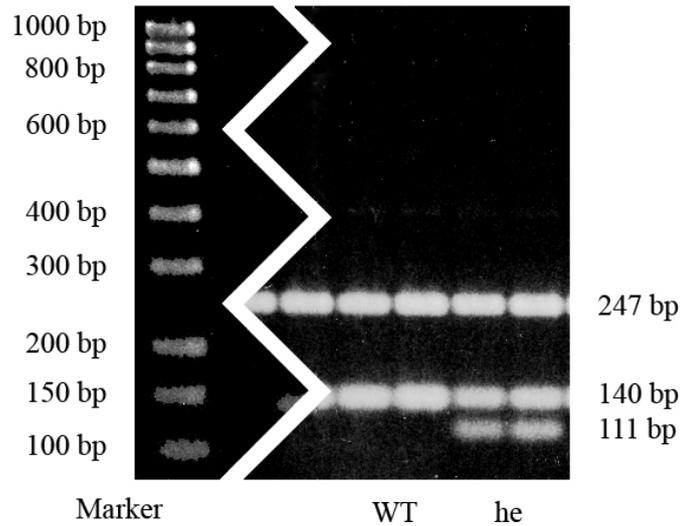


Abb. 18: Agarose-Gelelektrophorese der Mutation HFE C282Y

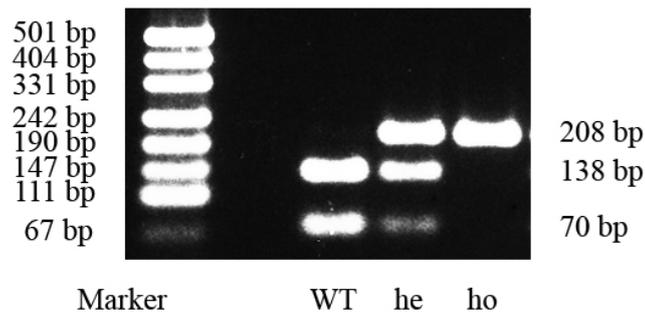


Abb. 19: Agarose-Gelelektrophorese der Mutation HFE H63D

4.4 Statistische Auswertung

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde anhand von Mehrfeldertafeln und Exakten Tests nach Fisher geprüft, ob Korrelationen zwischen Polymorphismus-Ausprägungen und den Ausprägungen von Therapie-Erfolgs-Surrogatparametern bestünden. Verwendet wurden dabei die fünf mittels Haplotypenanalyse bestimmten Ferroportin-Polymorphismen sowie die aussagekräftigsten, verfügbaren Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg.

Darüber hinaus wurde geprüft, ob Korrelationen zwischen Polymorphismus-Ausprägungen und dem Siderose-Surrogatparameter Serum-Ferritin vorlägen; die Tests erbrachten keine statistisch signifikanten Resultate.

4.4.1 Auswahl der Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg

Der erste Schritt der statistischen Auswertung bestand in der Bestimmung der aussagekräftigsten, verfügbaren Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg. Diese Bestimmung erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Die Parameter mussten sowohl vor Therapiebeginn als auch nach Therapieende bestimmt worden sein.
- Die Ausprägung vor Therapiebeginn musste stets einem „Nonresponse“ entsprechen.
- Die Ausprägungen nach Therapieende musste in einem Teil der Fälle einem „Response“ und in einem anderen Teil der Fälle einem „Nonresponse“ entsprechen.
- Die Bestimmung sollte möglichst lange nach Therapieende erfolgt sein, um so viele Relapser wie möglich ausgeschlossen zu haben.
- Die Parameter sollten in ihrem prädiktiven Charakter pathophysiologisch plausibel sein.

Patienten-Charakterisierungen zu einem Zeitpunkt später als 56 Wochen nach Therapieende existierten nicht. Leberbiopsien erfolgten ausschließlich vor Therapiebeginn. Als aussagekräftigste, verfügbare Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg wurden folgende zwei Kriterien identifiziert:

- Serum-Viruslast unterhalb der unteren Nachweisgrenze 56 Wochen nach Therapieende
- Serum-GPT-Wert unterhalb der oberen Normgrenze 56 Wochen nach Therapieende

4.4.2 Fallzahlen

Die Ausprägung der fünf ausgewählten Polymorphismen wurde bei 200 CHC-Patienten untersucht. Bei nicht eindeutigem Ergebnis wurden maximal zwei Wiederholungsversuche durchgeführt; die Anzahl der pro Polymorphismus letztlich erfolgreich charakterisierten Patienten ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Von den 200 genetisch untersuchten Patienten waren 182 klinisch charakterisiert; von diesen 182 hatten wiederum 165 eine Einverständniserklärung abgegeben; von diesen 165 waren in Abhängigkeit vom untersuchten Polymorphismus 80-84 durch Angaben zum Serum-GPT-Wert und 67-71 durch Angaben zur Serum-Viruslast 56 Wochen nach Therapieende charakterisiert (siehe Tab. 11).

Bei zwei Patienten wurde eine möglicherweise Hämochromatose-bedingende HFE C282Y/H63D-compound-Heterozygotie festgestellt. Für keinen der beiden Patienten liegen

klinische Daten aus der 56. Woche nach Therapieende vor. Die letzte vorliegende Serum-Viruslast-Bestimmung ergab bei beiden Werte oberhalb der unteren Nachweisgrenze. C282Y-Homozygotien wurden nicht beobachtet.

Tab. 11: Anzahl der pro Polymorphismus eindeutig charakterisierten Patienten

Polymorphismus	Anzahl aller eindeutig charakterisierten Patienten	Anzahl der Patienten mit vorliegender Einverständniserklärung und Angaben zur Serum-Viruslast 56 Wochen nach Therapieende	Anzahl der Patienten mit vorliegender Einverständniserklärung und Angaben zum Serum-GPT 56 Wochen nach Therapieende
c.1-310 CGG(7_9)	195	70	83
c.1-98 G>C	183	67	80
c.1-8 C>G	199	70	83
IVS4-141 G>A	200	71	84
c.663 T>C	200	71	84

4.4.3 Entscheidung über statistisches Testen

Die Entscheidung über das ob und die Methode des statistischen Testens fiel anhand der Betrachtung der auf den Seiten 53-56 wiedergegebenen zehn Mehrfeldertafeln; in allen in dieser Arbeit enthaltenen Mehrfeldertafeln sind Patienten jeweils durch die Ausprägungen eines Polymorphismus und eines Surrogatparameters für klinisch relevanten Therapieerfolg charakterisiert.

Mehrfeldertafeln mit Angaben zur Serum-Viruslast

Mehrfeldertafel 1

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	2	6	8
		%	25,0 %	75,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	5	31	36
		%	13,9 %	86,1 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	1	25	26
		%	3,8 %	96,2 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	8	62	70
		%	11,4 %	88,6 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 2

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
c.1-98 G>C	Wildtyp	Anzahl	4	36	40
		%	10,0 %	90,0 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	2	22	24
		%	8,3 %	91,7 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	1	2	3
		%	33,3 %	66,7 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	7	60	67
		%	10,4 %	89,6 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 3

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
c.1-8 C>G	Wildtyp	Anzahl	5	38	43
		%	11,6 %	88,4 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	2	23	25
		%	8,0 %	92,0 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	1	1	2
		%	50,0 %	50,0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	8	62	70
		%	11,4 %	88,6 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 4

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
IVS4-141 G>A	Wildtyp	Anzahl	7	60	67
		%	10,4 %	89,6 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	1	3	4
		%	25,0 %	75,0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	8	63	71
		%	11,3 %	88,7 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 5

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
c.663 T>C	Wildtyp	Anzahl	2	7	9
		%	22,2 %	77,8 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	3	28	31
		%	9,7 %	90,3 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	3	28	31
		%	9,7 %	90,3 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	8	63	71
		%	11,3 %	88,7 %	100,0 %

Mehrfeldertafeln mit Angaben zum Serum-GPT

Mehrfeldertafel 6

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	7	3	10
		%	70,0 %	30,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	31	8	39
		%	79,5 %	20,5 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	33	1	34
		%	97,1 %	2,9 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	71	12	83
		%	85,5 %	14,5 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 7

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-98 G>C	Wildtyp	Anzahl	45	5	50
		%	90,0 %	10,0 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	23	4	27
		%	85,2 %	14,8 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	1	2	3
		%	33,3 %	66,7 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	69	11	80
		%	86,3 %	13,8 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 8

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-8 C>G	Wildtyp	Anzahl	47	6	53
		%	88,7 %	11,3 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	24	4	28
		%	85,7 %	14,3 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	1	1	2
		%	50,0 %	50,0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	72	11	83
		%	86,7 %	13,3 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 9

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
IVS4-141 G>A	Wildtyp	Anzahl	68	11	79
		%	86,1 %	13,9 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	4	1	5
		%	80,0 %	20,0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	72	12	84
		%	85,7 %	14,3 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 10

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.663 T>C	Wildtyp	Anzahl	7	3	10
		%	70,0 %	30,0 %	100,0 %
	heterozygot	Anzahl	30	5	35
		%	85,7 %	14,3 %	100,0 %
	homozygot	Anzahl	35	4	39
		%	89,7 %	10,3 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	72	12	84
		%	85,7 %	14,3 %	100,0 %

Interpretation der Mehrfeldertafeln

Die sich aus der Betrachtung der obigen Mehrfeldertafeln ergebenden Konsequenzen werden am Beispiel der Mehrfeldertafel 10 dargestellt: In dieser Mehrfeldertafel wird die Charakterisierung von insgesamt 84 Patienten durch die beiden folgenden Parameter dargestellt:

- Polymorphismus Ferroportin c.663 T>C
- Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende

Unabhängig von der Ausprägung des Polymorphismus befindet sich der Serum-GPT-Wert bei 85,7 % der Patienten im Normbereich und bei 14,3 % der Patienten oberhalb des Normbereiches. Abhängig von der Ausprägung des Polymorphismus zeigen diese prozentuale Verteilung nur die heterozygoten Patienten – nicht jedoch die homozygoten und Wildtyp-Patienten. Eine Abhängigkeit des Serum-GPT-Wertes von der Polymorphismus-Ausprägung scheint also möglich. Um die Wahrscheinlichkeit anzugeben, mit der der Serum-GPT-Wert nicht unabhängig von der Polymorphismus-Ausprägung ist, ist statistisches Testen nötig. Da die Mehrfeldertafel Fallzahlen enthält, die kleiner als 5 sind, wird als Testverfahren der Exakte Test nach Fisher gewählt.

Jede der Mehrfeldertafeln 1 bis 10 zeigte eine mögliche Abhängigkeit des Therapie-Erfolgs-Surrogatparameters vom Polymorphismus. Folglich wurden beide Therapie-Erfolgs-Surrogatparameter auf Korrelation mit jedem der fünf Polymorphismen hin getestet. Da alle Mehrfeldertafeln Fallzahlen aufwiesen, die kleiner als 5 sind, wurde in jedem Fall der Exakte Test nach Fisher angewendet.

4.4.4 Statistische Testung

Ungeschichtet

Die Ergebnisse der Anwendung des Exakten Tests nach Fisher auf die Mehrfeldertafeln 1 bis 10 sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12: Ergebnisse der Anwendung des Exakten Tests nach Fisher auf die Mehrfeldertafeln 1 bis 10

Therapie-Erfolgs-Surrogatparameter	Polymorphismus	zugrunde liegende Mehrfeldertafel	Exakter Test nach Fisher: exakte, 2-seitige Signifikanz	Fallzahl
Serum-Viruslast	c.1-310 CGG(7_9)	Mehrfeldertafel 1	0,172	70
	c.1-98 G>C	Mehrfeldertafel 2	0,352	67
	c.1-8 C>G	Mehrfeldertafel 3	0,252	70
	IVS4-141 G>A	Mehrfeldertafel 4	0,387	71
	c.663 T>C	Mehrfeldertafel 5	0,524	71
Serum-GPT	c.1-310 CGG(7_9)	Mehrfeldertafel 6	0,018	83
	c.1-98 G>C	Mehrfeldertafel 7	0,052	80
	c.1-8 C>G	Mehrfeldertafel 8	0,252	83
	IVS4-141 G>A	Mehrfeldertafel 9	0,547	84
	c.663 T>C	Mehrfeldertafel 10	0,246	84

Bei Verzicht auf alpha-Adjustierung und Annahme eines Niveaus von $p < 0,05$ als signifikant erlauben die in Tabelle 12 präsentierten Testergebnisse folgende Aussage:

Die Ausprägung von Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss darauf, ob sich der Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende im oder über dem Normbereich befindet ($p=0,018$; $n=83$).

Die prozentuale Verteilung in Mehrfeldertafel 6 deutet darüber hinaus folgende Tendenz an:

Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich der Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende im Normbereich befindet, scheint in folgender Reihenfolge anzusteigen: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$.

Das signifikante Ergebnis der Anwendung des Exakten Tests nach Fisher auf die Mehrfeldertafel 6 erlaubt jedoch nicht, diese Tendenz als signifikant zu bezeichnen – die vorliegenden Daten deuten lediglich auf sie hin. Um den Einfluss der Allele $(CGG)_7$ und $(CGG)_8$ auf den Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende zu klären, wurden die Patienten deshalb auf zwei Arten neu gruppiert: Mehrfeldertafel 11 unterscheidet Patienten, die das Allel $(CGG)_8$ aufweisen (egal ob hetero- oder homozygot), von solchen, die dies nicht tun. Mehrfeldertafel 12 unterscheidet Patienten, die das Allel $(CGG)_7$ aufweisen, von denen, die dies nicht tun. Im Anschluss an die Betrachtung dieser Mehrfeldertafeln wurde in beiden Fällen ein Exakter Test nach Fisher durchgeführt (Resultate siehe Tab. 13).

Mehrfeldertafel 11: Patienten mit Allel $(CGG)_8$ versus Patienten ohne Allel $(CGG)_8$

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	$(CGG)_{7/7}$	Anzahl	7	3	10
		%	70,0 %	30,0 %	100,0 %
	$(CGG)_{7/8 \text{ oder } 8/8}$	Anzahl	64	9	73
		%	87,7 %	12,3 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	71	12	83
		%	85,5 %	14,5 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 12: Patienten mit Allel (CGG)₇ versus Patienten ohne Allel (CGG)₇

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	38	11	49
		%	77,6 %	22,4 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	33	1	34
		%	97,1 %	2,9 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	71	12	83
		%	85,5 %	14,5 %	100,0 %

Tab. 13

zugrunde liegende Mehrfeldertafel	Gruppierung der Patienten anhand der Ausprägung von c.1-310 CGG(7_9)	Exakter Test nach Fisher: exakte, 2-seitige Signifikanz	Fallzahl
Mehrfeldertafel 11	(CGG) ₈ vorhanden versus (CGG) ₈ nicht vorhanden	0,154	83
Mehrfeldertafel 12	(CGG) ₇ vorhanden versus (CGG) ₇ nicht vorhanden	0,023	83

Die kombinierte Betrachtung von Mehrfeldertafel 12 und Tabelle 13 erlaubt nun folgende zwei Aussagen:

- Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₇ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₈ – ist signifikant assoziiert mit einem oberhalb des Normbereiches liegenden Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende.
- Das bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₈ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₇ – ist signifikant assoziiert mit einem innerhalb des Normbereiches liegenden Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende.

Definiert man den Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie über einen Serum-GPT-Wert, der sich 56 Wochen nach Therapieende im Normbereich befindet, so erlauben die bisherigen statistischen Betrachtungen und Tests folgende Aussagen:

1. Die Ausprägung des Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss auf den Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie.
2. Die Wahrscheinlichkeit für Therapieerfolg scheint tendenziell – wenn auch nicht signifikant - in folgender Reihenfolge anzusteigen: (CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}.
3. Das bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₈ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₇ – ist signifikant mit Therapieerfolg assoziiert.
4. Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₇ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₈ – ist signifikant mit Therapieversagen assoziiert.

Definiert man Therapieerfolg über eine unterhalb der unteren Nachweisgrenze liegende Serum-Viruslast, so werden alle soeben getroffenen Aussagen tendenziell – wenn auch nicht signifikant - bestätigt (siehe Mehrfeldertafeln 1 und 13).

Mehrfeldertafel 13: Patienten mit Allel (CGG)₇ versus Patienten ohne Allel (CGG)₇

			Serum-Viruslast: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der unteren Nachweisgrenze		Gesamt
			nein	ja	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	7	37	44
		%	15,9 %	84,1 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	1	25	26
		%	3,8 %	96,2 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	8	62	70
		%	11,4 %	88,6 %	100,0 %

Geschichtet

Die im vorigen Kapitel getroffenen Aussagen beziehen sich auf ein Patientenkollektiv, das nicht geschichtet ist: weder nach Behandlungsregime, noch nach Virusgenotyp oder Geschlecht.

Im nun folgenden Schritt wurde eine geschichtete Betrachtung und Testung des Patientenkollektivs durchgeführt; dabei wurde geprüft, inwieweit die im ersten Schritt getroffenen vier Aussagen wiederholbar wären. Die Schichtung erfolgte nach Therapieregime, Therapieregime und Virusgenotyp sowie in allen Schichten zusätzlich nach Geschlecht. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die betrachteten und getesteten Schichten und ihre jeweiligen Fallzahlen. Die Ergebnisse der Testungen der einzelnen Schichten sind in Tabelle 16 und 17 dargestellt. Die den Testungen zugrunde liegenden Mehrfeldertafeln sind im Abschnitt

„Schichten charakterisierende Mehrfeldertafeln“ (S. 66ff) wiedergegeben. Dabei beziehen sich Tabelle 16 und die „Mehrfeldertafeln mit nominaler Polymorphismuskodierung“ (S. 66ff) auf die beiden ersten der bisher getroffenen vier Aussagen:

- Die Ausprägung des Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss darauf, ob sich der Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende im Normbereich befindet.
- Die Wahrscheinlichkeit für einen derart definierten Therapieerfolg scheint tendenziell – wenn auch nicht signifikant - in folgender Reihenfolge anzusteigen: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$.

Tabelle 17 und die „Mehrfeldertafeln mit dichotomer Polymorphismuskodierung“ (S. 68ff) beziehen sich auf die dritte und vierte bisher getroffene Aussage:

- Das bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_8$ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_7$ – ist signifikant mit einem GPT-definierten Therapieerfolg assoziiert.
- Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_7$ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_8$ – ist signifikant mit GPT-definiertem Therapieversagen assoziiert.

Schichtung nach Therapieregime

Die erste Schichtung erfolgte anhand des Therapieregimes. Das ungeschichtete Kollektiv umfasste Patienten, die vier verschiedenen Therapieregimen folgend behandelt worden waren; diese Regime unterschieden sich voneinander in der Wirkstoffkombination und der Wirkstoffdosierung (siehe Tab. 14); während die Wirkstoffkombination für jeden einzelnen Patienten genau dokumentiert ist, lässt sich die Wirkstoffdosierung pro kg Körpergewicht aufgrund fehlender Körpergewichtsangaben und uneindeutiger Ribavirin-Dosierungsvorschriften nicht präzise angeben. Aus diesem Grund erfolgte keine Schichtung nach Wirkstoffdosierung - geschichtet wurde nur nach Wirkstoffkombination: Hierzu wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt; die größere Gruppe (n=70) umfasste alle mit einer Consensus-Interferon-Ribavirin-Kombinationstherapie Behandelten (Regime 1-3), die kleinere (n=4) schloss alle Consensus-Interferon-Monotherapierten ein (Regime 4). Aufgrund ihrer geringen Größe und des Umstandes, dass die Polymorphismusmanifestation $(CGG)_{7/7}$ in ihr nicht auftrat, wurde diese Schicht von der Testung ausgeschlossen. Statistisch getestet wurde nur die Schicht der Consensus-Interferon-Ribavirin-Kombinationstherapierten.

Tab. 14: Therapieregime

	Regime 1	Regime 2	Regime 3	Regime 4
Woche 1-4	CIFN 27 µg/ Tag	CIFN 18 µg/ Tag	CIFN 18 µg/ Tag	CIFN 18 µg/ Tag
Woche 5-12	CIFN 18 µg/ Tag	CIFN 9 µg/ Tag	CIFN 9 µg/ Tag	CIFN 9 µg/ Tag
Woche 13-36	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 1.000 oder 1.200 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 1.000 oder 1.200 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 600 oder 800 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche
Woche 37-48 (nur wenn negativer HCV- RNA-Befund nach Woche 36)	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 1.000 oder 1.200 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 1.000 oder 1.200 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche + Ribavirin 600 oder 800 mg/ Tag	CIFN 3 x 9 µg/ Woche

CIFN: Consensus-Interferon

Schichtung nach Therapieregime und Virusgenotyp

Das Kollektiv der Consensus-Interferon-Ribavirin-Kombinationstherapierten wurde in einem weiteren Schritt zusätzlich anhand der Virusgenotypen geschichtet (siehe Tab. 15). Beobachtet wurden dabei die Virusgenotypen 1, 2 und 3. Die Gruppen der mit den Virusgenotypen 2 und 3 infizierten Patienten beinhalteten ausschließlich Patienten, deren Serum-GPT sich innerhalb des Normbereiches befand; statistisch testbar war also nur die Gruppe der mit Virusgenotyp 1 Infizierten.

Zusätzliche Schichtung nach Geschlecht

In einem letzten Schichtungsschritt wurden die drei bisher getesteten Kollektive (d. h. das ungeschichtete Patientenkollektiv, die Schicht der Kombinationstherapierten und die Schicht der kombinationstherapierten Virusgenotyp-1-Infizierten) zusätzlich nach Geschlecht geschichtet und getestet (siehe Tab. 15).

Ergebnisse der geschichteten Testung

Die getesteten Schichten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Schichten, die beide Geschlechter enthalten, und Schichten die nur je ein Geschlecht enthalten.

Die Testungen der Schichten, die sowohl Frauen als auch Männer enthalten, führten allesamt zu signifikanten Testergebnissen und uneingeschränkten Bestätigungen der anhand der Testung des ungeschichteten Kollektivs gewonnenen vier Aussagen (siehe Tab. 16 und 17).

Die geschlechtsspezifischen Schichten unterschieden sich hinsichtlich Größe und Testergebnis.

In den Frauengruppen wurde der Einfluss des Polymorphismus auf einen GPT-definierten Therapieerfolg in keinem Fall als signifikant gewertet und nur in der kleinsten von drei Gruppen deuteten die Daten an, dass die Therapieerfolgswahrscheinlichkeit in der bisher beobachteten

Reihenfolge $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$ ansteige (siehe Mehrfeldertafeln 16 bis 18). In den beiden anderen Gruppen wurde folgende Reihenfolge angedeutet: $(CGG)_{7/8} < (CGG)_{7/7} < (CGG)_{8/8}$. Bei einer Aufteilung der Frauengruppen anhand des Kriteriums „Vorhandensein versus Nichtvorhandensein von Allel $(CGG)_7$ “ war jedoch wieder die angedeutete Tendenz zu beobachten, dass das Vorhandensein von Allel $(CGG)_7$ mit GPT-definiertem Therapieversagen assoziiert sei (siehe Mehrfeldertafeln 24 bis 26).

In den Männergruppen wurde der signifikante Einfluss des Polymorphismus auf den GPT-definierten Therapieerfolg in allen Fällen ebenso bestätigt wie die Tendenz, dass die Wahrscheinlichkeit für Therapieerfolg in folgender Reihenfolge ansteige: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$. Auch die Aussage, dass das mono- oder bi-chromosomale Vorhandensein des Allels $(CGG)_7$ im Gegensatz zum bi-chromosomalen Auftreten des Allels $(CGG)_8$ mit GPT-definiertem Therapieversagen assoziiert sei, wurde in der größten der drei Männergruppen als signifikant gewertet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der geschichteten Testung und insbesondere der geschlechtsspezifischen, geschichteten Testung ist jedoch der Einfluss der Fallzahl innerhalb der einzelnen Schichten zu beachten. Die geschlechtsunspezifischen Schichten sind wesentlich größer als die entsprechenden geschlechtsspezifischen Schichten – und innerhalb der geschlechtsspezifischen Gruppen sind wiederum die Männergruppen wesentlich größer als die entsprechenden Frauengruppen. Während das ungeschichtete Patientenkollektiv 83 Probanden umfasst, enthält selbst die größte frauenspezifische Schicht nur noch 32 Probandinnen, die kleinste nur 13.

Ergebnisse

Tab. 15: Schichten des Kollektivs, für das folgende zwei Parameter eindeutig bestimmt sind:

- „Ausprägung von c.1-310 CGG(7_9)“

- „Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze [ja/nein]“

Anzahl Patienten		Patientengruppe
83		Ungeschichtetes Patientenkollektiv
	70	CIFN-Ribavirin-Kombinationstherapie
		Virusgenotyp 1
	41	Virusgenotyp 2 *
	7	Virusgenotyp 3 *
	22	
	4	CIFN-Monotherapie **
	9	Unbekanntes Therapieregime
83		Ungeschichtetes Patientenkollektiv
	32	Frauen
	47	Männer
	4	Unbekanntes Geschlecht
70		Kombinationstherapierte
	24	Frauen
	42	Männer
	4	Unbekanntes Geschlecht
41		Kombinationstherapierte mit Virusgenotyp-1-Infektion
	13	Frauen
	25	Männer
	3	Unbekanntes Geschlecht

CIFN: Consensus-Interferon

* GPT nur im Normbereich: die Schicht ist nicht auswertbar

** (CGG)_{7/7} tritt in dieser Gruppe nicht auf: Die Schicht wurde nicht getestet.

Fettdruck: diese Schichten wurden statistisch getestet.

Ergebnisse

Tab. 16: Ergebnisse der statistischen Testung einzelner Schichten anhand von Mehrfeldertafeln, in denen die Ausprägung des Polymorphismus **nominal** kodiert ist

Schicht	zugrunde liegende Mehrfeldertafel	Exakter Test nach Fisher: exakte, 2-seitige Signifikanz	Fallzahl
Alle Patienten	Mehrfeldertafel 6	0,018	83
Kombinationstherapierte Patienten	Mehrfeldertafel 14	0,013	70
Kombinationstherapierte Patienten mit Virusgenotyp 1	Mehrfeldertafel 15	0,014	41
Alle Frauen	Mehrfeldertafel 16	0,497	32
Kombinationstherapierte Frauen	Mehrfeldertafel 17	0,296	24
Kombinationstherapierte Virusgenotyp-1-infizierte Frauen	Mehrfeldertafel 18	0,276	13
Alle Männer	Mehrfeldertafel 19	0,032	47
Kombinationstherapierte Männer	Mehrfeldertafel 20	0,017	42
Kombinationstherapierte Virusgenotyp-1-infizierte Männer	Mehrfeldertafel 21	0,045	25

Tab. 17: Ergebnisse der statistischen Testung einzelner Schichten, anhand von Mehrfeldertafeln, in denen die Ausprägung des Polymorphismus **dichotom** kodiert ist

Schicht	zugrunde liegende Mehrfeldertafel	Exakter Test nach Fisher: exakte, 2-seitige Signifikanz	Fallzahl
Alle Patienten	Mehrfeldertafel 12	0,023	83
Kombinationstherapierte Patienten	Mehrfeldertafel 22	0,018	70
Kombinationstherapierte Patienten mit Virusgenotyp 1	Mehrfeldertafel 23	0,014	41
Alle Frauen	Mehrfeldertafel 24	0,370	32
Kombinationstherapierte Frauen	Mehrfeldertafel 25	0,262	24
Kombinationstherapierte Virusgenotyp-1-infizierte Frauen	Mehrfeldertafel 26	0,228	13
Alle Männer	Mehrfeldertafel 27	0,026	47
Kombinationstherapierte Männer	Mehrfeldertafel 28	0,114	42
Kombinationstherapierte Virusgenotyp-1-infizierte Männer	Mehrfeldertafel 29	0,105	25

Schichten charakterisierende Mehrfeldertafeln

Mehrfeldertafeln mit nominaler Polymorphismuskodierung

Mehrfeldertafel 14: Kombinationstherapierte Patienten

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	7	3	10
		%	70,0 %	30,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	27	5	32
		%	84,4 %	15,6 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	28	0	28
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		62	8	70
	%		88,6 %	11,4 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 15: Kombinationstherapierte Patienten mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	3	3	6
		%	50,0 %	50,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	14	5	19
		%	73,7 %	26,3 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	16	0	16
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		33	8	41
	%		80,5 %	19,5 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 16: alle Frauen

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	4	1	5
		%	80,0 %	20,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	11	4	15
		%	73,3 %	26,7 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	11	1	12
		%	91,7 %	8,3 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		26	6	32
	%		81,3 %	18,8 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 17: Kombinationstherapierte Frauen

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	4	1	5
		%	80,0 %	20,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	8	3	11
		%	72,7 %	27,3 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	8	0	8
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	20	4	24
		%	83,3 %	16,7 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 18: Kombinationstherapierte Frauen mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	1	1	2
		%	50,0 %	50,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	4	3	7
		%	57,1 %	42,9 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	4	0	4
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	9	4	13
		%	69,2 %	30,8 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 19: alle Männer

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	3	2	5
		%	60,0 %	40,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	17	4	21
		%	81,0 %	19,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	21	0	21
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	41	6	47
		%	87,2 %	12,8 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 20: Kombinationstherapierte Männer

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	3	2	5
		%	60,0 %	40,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	16	2	18
		%	88,9 %	11,1 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	19	0	19
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		38	4	42
	%		90,5 %	9,5 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 21: Kombinationstherapierte Männer mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7}	Anzahl	2	2	4
		%	50,0 %	50,0 %	100,0 %
	(CGG) _{7/8}	Anzahl	8	2	10
		%	80,0 %	20,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	11	0	11
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		21	4	25
	%		84,0 %	16,0 %	100,0 %

Mehrfeldertafeln mit dichotomer Polymorphismuskodierung

Mehrfeldertafel 22: Kombinationstherapierte Patienten

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	34	8	42
		%	81,0 %	19,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	28	0	28
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl		62	8	70
	%		88,6 %	11,4 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 23: Kombinationstherapierte Patienten mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	17	8	25
		%	68,0 %	32,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	16	0	16
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	33	8	41
		%	80,5 %	19,5 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 24: alle Frauen

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	15	5	20
		%	75,0 %	25,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	11	1	12
		%	91,7 %	8,3 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	26	6	32
		%	81,3 %	18,8 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 25: Kombinationstherapierte Frauen

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	12	4	16
		%	75,0 %	25,0 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	8	0	8
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	20	4	24
		%	83,3 %	16,7 %	100,0 %

Ergebnisse

Mehrfeldertafel 26: Kombinationstherapierte Frauen mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	5	4	9
		%	55,6 %	44,4 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	4	0	4
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	9	4	13
		%	69,2 %	30,8 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 27: alle Männer

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	20	6	26
		%	76,9 %	23,1 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	21	0	21
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	41	6	47
		%	87,2 %	12,8 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 28: Kombinationstherapierte Männer

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder 7/8	Anzahl	19	4	23
		%	82,6 %	17,4 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	19	0	19
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	38	4	42
		%	90,5 %	9,5 %	100,0 %

Mehrfeldertafel 29: Kombinationstherapierte Männer mit Virusgenotyp 1

			Serum-GPT: 56 Wochen nach Therapieende unterhalb der oberen Normgrenze		Gesamt
			ja	nein	
c.1-310	(CGG) _{7/7} oder _{7/8}	Anzahl	10	4	14
		%	71,4 %	28,6 %	100,0 %
	(CGG) _{8/8}	Anzahl	11	0	11
		%	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt		Anzahl	21	4	25
		%	84,0 %	16,0 %	100,0 %

4.4.5 Zusammenfassung dieser Analyse

Definiert man den Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie über einen Serum-GPT-Wert, der sich 56 Wochen nach Therapieende im Normbereich befindet, so lassen sich die Ergebnisse der statistischen Auswertung folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Ausprägung des Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss auf den Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie.
2. Die Wahrscheinlichkeit für Therapieerfolg scheint tendenziell in folgender Reihenfolge anzusteigen: (CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}.
3. Das bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₈ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₇ – ist signifikant mit Therapieerfolg assoziiert.
4. Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von (CGG)₇ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von (CGG)₈ – ist signifikant mit Therapieversagen assoziiert.

Diese Aussagen konnten unabhängig von Therapieregime sowie Therapieregime und Virusgenotyp getroffen werden.

5 Diskussion

Diese Arbeit stellt die Frage, ob es im Ferroportin-Gen Polymorphismen gibt, die Vorhersagen erlauben über Erfolg oder Versagen Interferon-basierter Therapien der chronischen Hepatitis C. Die hier erarbeiteten Ergebnisse legen dieses nahe.

Die Frage wurde aus folgendem Grund gestellt: Die chronische Hepatitis C (CHC) ist eine Krankheit mit hoher und anscheinend wachsender Prävalenz und Inzidenz, ohne verfügbare Impfung, mit großteils unbekanntem Infektionsweg, die nur durch Lebertransplantation oder Interferon-basierte Medikation behandelt werden kann. Die medikamentöse Therapie kann bis zu 72 Wochen dauern; die von ihr verursachten Nebenwirkungen treten häufig auf und können Lebensqualität und Erwerbsfähigkeit stark einschränken. Der Erfolg der Therapie lässt sich oft erst Monate nach ihrem Ende beurteilen. In Abhängigkeit vom behandelten und untersuchten Patientenkollektiv beträgt die Therapie-Erfolgsquote teils nur 50 %. Prädiktoren, die die Therapieerfolgswahrscheinlichkeit bereits vor Therapiebeginn abschätzen ließen, würden Ärzten bei der Beratung und Patienten bei der Entscheidung über Therapiefortführung, -abbruch und –wiederaufnahme helfen. Im Idealfall könnten sie das Verständnis über die Pathomechanismen der CHC erweitern und zur Verbesserung bestehender oder zur Entwicklung neuer, kausaler Therapieformen führen.

Warum wurde bei der Suche nach möglichen Therapieerfolgsprädiktoren das Gen Ferroportin untersucht? Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass erhöhter hepatozytärer Eisengehalt mit verringerten Therapieerfolgswahrscheinlichkeiten assoziiert sei. Das Ferroportin-Protein ist der zurzeit einzig bekannte Transporter intrazellulären Eisens in den Extrazellularraum. Varianten in Struktur oder Expression dieses Proteins könnten entscheidenden Einfluss auf den hepatozytären Eisengehalt und somit auf den Therapieverlauf aufweisen.

Die Beantwortung der Frage, ob das Ferroportin-Gen Polymorphismen aufweise, die CHC-Therapieerfolgsprädiktoren sein könnten, verlief in den folgenden vier Schritten:

- Sequenzanalyse
- Haplotypenanalyse
- Polymorphismenscreening
- Statistische Auswertung

Sequenzanalyse: Zweck dieses ersten Arbeitsschrittes war es, häufige Polymorphismen in den funktionell relevanten Gen-Regionen zu identifizieren. Nach häufigen Polymorphismen wurde gefragt, da nach Prädiktoren häufiger Zustände gesucht wurde: Therapieerfolg und Therapieversagen sind beides häufige Ausgänge Interferon-basierter CHC-Therapien. Um eine eventuelle, unfreiwillige Vorauswahl der Polymorphismen so gut es geht zu vermeiden, wurde dieser Untersuchungsschritt an einem möglichst diversifizierten Probandenkollektiv vorgenommen; es bestand sowohl aus gesunden Probanden als auch aus CHC-Patienten mit unterschiedlichen Virusgenotypen und Therapieausgängen. Diversität war hier erwünscht.

Insgesamt wurden 65 Probanden untersucht: 50 CHC-Patienten und 15 klinisch unauffällige Institutsmitarbeiter. Folgende Abschnitte des Ferroportin-Gens wurden dabei einer Sequenzanalyse unterzogen: die 5'-UTR, die 3'-UTR, alle acht Exone und die an die Exone angrenzenden Bereiche der Introne. Insgesamt wurden elf Polymorphismen-Loci identifiziert. Sieben dieser Polymorphismen sind in der Literatur bereits beschrieben, vier werden an dieser Stelle zum ersten Mal dargestellt (siehe Tab. 8).

Bei zehn Polymorphismen handelt es sich um SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) – bei einem um eine Deletion/Insertion von drei Basenpaaren (CGG) innerhalb eines Repeats eben dieser drei Basenpaare: Dieser Polymorphismus befindet sich in der 5'-UTR. Von den zehn SNPs sind weitere zwei in der 5'-UTR, einer in der 3'-UTR, sechs intronisch und einer exonisch lokalisiert; der exonische Polymorphismus bewirkt keinen Aminosäureaustausch.

In der 5'-UTR befindet sich an der Position c.1-194-233 ein die Translation beeinflussendes Iron Responsive Element (IRE). Die drei in der 5'-UTR identifizierten Polymorphismen flankieren dieses IRE: Sie sind 77 Basenpaare vor sowie 96 bzw. 186 Basenpaare hinter dem IRE lokalisiert. Das in der 5'-UTR befindliche IRE wurde als funktional beschrieben (128): Ein an das IRE bindendes IRP (Iron Regulatory Protein) inhibiert die Translation der Ferroportin-mRNA (129).

Von den sieben im betrachteten Probandenkollektiv beobachteten, bereits publizierten Polymorphismen sind vier in der Literatur funktional betrachtet worden (PM1, 2, 3, 5) (130): Dabei wurde erfolglos nach Assoziationen zwischen den einzelnen Polymorphismen und Veränderungen der Serum-Ferritin- und –Transferrin-Werte gefragt. Unserem Kenntnisstand nach handelt es sich hierbei um die zurzeit einzige vorliegende Studie zur Funktionalität der benannten Polymorphismen. Darüber hinaus muss betont werden, dass es sich bei der Abwesenheit eines Assoziations-Beweises nicht um den Beweis der Assoziations-Abwesenheit

handelt.

Unabhängig von den Ergebnissen der hier durchgeführten Sequenzanalyse sind für das Ferroportin-Gen in der NCBI-SNP-Datenbank 152 Polymorphismen verzeichnet (Stand 22.07.2008) – darunter neun Aminosäuren-tauschende, die mit der Hämochromatose Typ IV assoziiert sind (siehe Kapitel 1.3.7). Keiner der Hämochromatose-assoziierten Polymorphismen wurde im untersuchten Kollektiv beobachtet.

Haplotypenanalyse: Im ersten Arbeitsschritt waren Ferroportin-Polymorphismen anhand eines gewollt uneinheitlichen Probandenkollektivs identifiziert worden. Dieses mit 65 Probanden auch vergleichsweise kleine Kollektiv war nur für den Zweck der Polymorphismen-Identifizierung bestimmt; es sollte nicht auf Korrelationen zwischen Polymorphismen und Therapie-Erfolgs-Surrogatparametern hin getestet werden. Diese Tests sollten an einem wesentlich größeren und vor allem möglichst einheitlichen, zweiten Kollektiv erfolgen. Um multiples Testen auf ein Mindestmaß zu beschränken, sollte dieses zweite Kollektiv auch nicht wahllos auf alle im ersten Arbeitsschritt identifizierten Polymorphismen hin getestet werden. Getestet werden sollten nur die funktional wahrscheinlich relevanten, nicht absolut aneinander gekoppelt aufgetretenen, häufigen Polymorphismen. Die Identifizierung dieser Polymorphismen erfolgte mittels Haplotypenanalyse (siehe Kapitel 4.2). Von den elf in der Sequenzanalyse bestimmten Polymorphismen wurden fünf ausgewählt: alle drei in der 5'-UTR befindlichen Polymorphismen sowie der exonische und ein an dieser Stelle erstbeschriebener intronischer Polymorphismus.

Polymorphismenscreening: In diesem Arbeitsschritt wurde ein 200 CHC-Patienten umfassendes Probandenkollektiv auf die fünf mittels Haplotypenanalyse identifizierten Polymorphismen hin gescreent. Um für den späteren Test auf Korrelation zwischen Polymorphismen und Therapie-Erfolgs-Parametern möglichst viele Störvariablen auszuschließen, wurde ein Kollektiv gewählt, das ausschließlich aus therapienaiven CHC-Patienten bestand, die einen strengen Katalog an Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen mussten (siehe Kapitel 3.1.3). Um eine in der Klinik eventuell unerkannt gebliebene Hämochromatose als Störvariable auszuschließen, wurden die 200 Patienten auch auf die zum Untersuchungszeitpunkt bekannten, häufigsten mit Hämochromatose assoziierten Mutationen HFE C282Y und H63D hin gescreent. C282Y-Homozygotie wurde nicht beobachtet; C282Y/H63D-compound-Heterozygotie wurde in zwei Fällen festgestellt, die nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen wurden.

Statistische Auswertung: Zweck dieses Arbeitsschrittes war es, folgende Frage zu beantworten: Könnte der Ausgang einer Interferon-basierten Therapie einer chronischen Hepatitis C abhängig von einem oder mehreren der häufigen Ferroportin-Polymorphismen sein?

Die Beantwortung dieser Frage erfolgte in mehreren Schritten: Zuerst wurde eine Definition des idealen Therapieerfolges vorgenommen (s. u.); da dieser bei noch keinem der untersuchten Patienten bestimmbar war, folgte die Suche nach Surrogatparametern. Hierzu wurde zuerst die Literatur auf verwendete Surrogatparameter für CHC-Therapieerfolg hin durchsucht; im Anschluss erfolgte eine Betrachtung der Grenzen der Aussagekraft dieser Surrogatparameter. Abschließend wurden die klinischen Charakterisierungen der in dieser Arbeit untersuchten Patienten auf die aussagekräftigsten, erhobenen Surrogatparameter hin gesichtet. Zwei Parameter wurden als Surrogatparameter ausgewählt und in der statistischen Testung als Ersatz für den nicht erhebbaren, ideal definierten Therapieerfolg verwendet. Die statistische Testung selbst erfolgte anhand von Mehrfeldertafeln, in denen Patientengruppen einerseits durch die nominale Ausprägung eines Ferroportin-Polymorphismus und andererseits durch die dichotome Ausprägung eines Surrogatparameters für klinisch relevanten Therapieerfolg beschrieben wurden.

Therapieerfolg: Idealerweise wäre er durch eine Rückbildung aller bestehenden pathologischen Veränderungen und ein Nichteintreten von Komplikationen definiert. Da jedoch Komplikationen wie Leberzirrhose und Hepatozelluläres Karzinom oft erst Jahrzehnte nach der Infektion auftreten, kann auch ihr Nichteintreten erst Jahrzehnte nach der Infektion und damit unter Umständen auch erst Jahrzehnte nach dem Therapieende ausgeschlossen werden. Der Erfolg einer Therapie kann pragmatischerweise also nur an Ersatzparametern gemessen werden: an Parametern, die in einem kürzeren Zeitraum nach Therapieende bestimmt werden. Diese Parameter werden Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg genannt (siehe Kapitel 1.1.11). Zwei sind gebräuchlich: das so genannte nachhaltige virale Ansprechen (SVR = Sustained Viral Response) und das biochemische Ansprechen. Beide werden sechs Monate nach Therapieende bestimmt und sind folgendermaßen definiert: Nachhaltiges virales Ansprechen entspricht einer Serum-Viruslast unterhalb der unteren Nachweisgrenze - biochemisches Ansprechen entspricht einem Serum-GPT-Wert innerhalb des Normbereiches.

In frühen Studien zum Erfolg von CHC-Therapien wurde überwiegend das biochemische Ansprechen als Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg verwendet (51). Heutzutage ist virales Ansprechen der am meisten verwendete Surrogatparameter. Keiner der beiden Parameter ist jedoch validiert (siehe Kapitel 1.1.11) und keiner von beiden ist unstrittig.

Folgende Umstände führten vermutlich zur vermehrten Verwendung des viralen Ansprechens als Surrogatparameter:

Es wurde beschrieben, dass virale Ansprechraten geringer seien als biochemische (131), und dass Patienten mit biochemischem Ansprechen z. T. noch virämisch waren (132). In vereinzelten Fällen wurde trotz vorliegenden biochemischen Ansprechens das histologische und klinische Fortschreiten einer CHC beobachtet (133, 134). Eine Studie beschrieb, dass Patienten mit anhaltend normaler GPT weniger histologisch beschreibbare Leberschäden aufwiesen, wenn im Serum auch keine HCV-RNA nachweisbar war (135).

Diese Beobachtungen ließen vermutlich annehmen, dass virales Ansprechen seltener zu falsch positiven Test-Resultaten führe als biochemisches Ansprechen. Diese Annahme konnte methodenbedingt bisher jedoch noch nicht überprüft werden (siehe S. 10f). Auch existieren eine Reihe von Beobachtungen, die es fraglich erscheinen lassen, ob virales Ansprechen ein verlässlicherer Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg ist als biochemisches Ansprechen:

Auch bei nicht erreichtem viralen Ansprechen wurde histologisches Ansprechen beobachtet (136). Bei Serum-Viruslast unterhalb der unteren Nachweisgrenze wurde folgende Befundkombination beschrieben: erhöhtes Serum-GPT, histologisch gesicherte Leberentzündung mit Leberfibrose sowie HCV-RNA-Nachweis in Hepatozyten (42). In zahlreichen Studien konnte keine Korrelation zwischen Leber-Viruslast und histologisch beschriebenem Leberschaden gefunden werden (137-141), während eine Korrelation zwischen Viruslast in Leber und Serum gesehen wurde (138). Während zahlreiche Studien beschreiben, dass Patienten mit anhaltend normalem GPT weniger wahrscheinlich eine Leberfibroseprogression erfahren als Patienten mit erhöhtem GPT (133, 134, 142-148), halten sich die Anzahl der Studien, die der Serum-Viruslast einen Einfluss auf die Fibroseprogression zuschreiben (147-149), und die, die dies nicht tun (138, 144, 150), die Waage. Auch Review-Artikel und Leitlinien betrachten GPT als etablierten (26, 151) und die Serum-Viruslast bestenfalls als strittigen Prädiktor einer Leberfibroseprogression (26, 137, 151).

Die Aussagekraft des viralen Ansprechens als Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg wird darüber hinaus dadurch eingeschränkt, dass der Nichtnachweis von HCV-RNA nicht automatisch das Nichtvorhandensein von HCV-RNA im Serum bedeutet; er kann dies bedeuten; er kann aber auch das Vorhandensein einer Menge von HCV-RNA bedeuten, die lediglich unterhalb der unteren Nachweisgrenze des verwendeten Verfahrens liegt. Diese untere

Nachweisgrenze ist kein fixer Wert – sie ist abhängig von der Bestimmungsmethode, vom Hersteller des Tests und vom in der Probe vorliegenden Virusgenotyp (152). Hinzu kommt, dass die Sensitivität von Viruslastbestimmungsverfahren umso kleiner wird, je kleiner die Menge der in der Probe vorhandenen HCV-RNA ist (153).

In Bezug auf die Serum-Viruslast muss erwähnt werden, dass im Rahmen der Studie zwei verschiedene Bestimmungsverfahren Anwendung fanden: „COBAS AMPLICOR HCV Monitor v2.0“ der Firma Roche und „Ortho trak-c“ der Firma Johnson & Johnson. Der erste Test weist HCV-RNA im Serum nach, der zweite ein HCV-Coreantigen. Entscheidender als der Unterschied in der Nachweismethode ist jedoch der Unterschied in Bezug auf die untere Nachweisgrenze: Dem ersten Test wird eine untere Nachweisgrenze von 600 IU/ml (154) bei einer Konzentration von 2,5 Viruskopien pro IU zugeschrieben (155, 156). Die untere Nachweisgrenze liegt also ungefähr bei 1500 Viruskopien/ml. Der zweite Test hat laut Hersteller eine untere Nachweisgrenze von 1,5 pg Coreantigen/ml; Aussagen dazu, wie viel pg Coreantigen wie vielen Viruskopien entsprechen, bzw. ob zwischen Coreantigenmasse und Viruskopienanzahl überhaupt eine Korrelation besteht, werden nicht gemacht. Messungen von anderer Seite ergaben, dass mit dem trak-c-Test negativ getestete Proben HCV-RNA mit Konzentrationen bis zu 7700 Viruskopien/ml enthielten (157). Dieser Studie folgend wird die untere Nachweislast des trak-c-Tests bei 8000 Viruskopien/ml gesehen. Die unteren Nachweisgrenzen der beiden verwendeten Verfahren unterscheiden sich also um mehr als den Faktor 4.

Zwar ist die Wertigkeit von nachhaltigem viralem Ansprechen und biochemischem Ansprechen als Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg zur Zeit nicht gesichert, diese Sicherung ist allerdings auch noch nicht möglich; in Abwesenheit eines validierten Surrogatparameters für klinisch relevanten Therapieerfolg einer CHC-Therapie wurde deshalb in der statistischen Auswertung dieser Arbeit der Therapieerfolg sowohl durch virales als auch durch biochemisches Ansprechen definiert.

Die Patienten des untersuchten Kollektivs waren nach Therapieende sowohl durch Serum-Viruslast als auch durch Serum-GPT charakterisiert; Leberbiopsien waren nur vor Therapiebeginn nicht aber nach Therapieende erfolgt. Die letzte Bestimmung von Viruslast und GPT war drei, sechs und 12 Monate nach Therapieende erfolgt. Um so viele Relapser wie möglich auszuschließen, wurden als Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg die 12 Monate nach Therapieende erhobenen Werte verwendet.

Nicht für alle genetisch charakterisierten Patienten waren sowohl Serum-Viruslast als auch Serum-GPT 12 Monate nach Therapieende beschrieben. Es gab Patienten, die durch beide, einen der beiden als auch keinen der beiden Parameter beschrieben waren (siehe Tab. 11).

Bei der statistischen Testung wurde anhand von Mehrfeldertafeln und Exakten Tests nach Fisher geprüft, ob Korrelationen zwischen Polymorphismus- und Surrogatparameter-Ausprägungen bestünden. In diese Testung einbezogen wurden einerseits die fünf mittels Haplotypenanalyse bestimmten Ferroportin-Polymorphismen und andererseits die über die Ausprägung von Serum-Viruslast und -GPT definierten Surrogatparameter für klinisch relevanten Therapieerfolg. Die Testung erfolgte in mehreren Schritten.

Erste ungeschichtete Testung: Um die Suche nach eventuell vorhandenen Korrelationen mit möglichst großen Fallzahlen zu beginnen, erfolgte die statistische Testung zuerst anhand des ungeschichteten Patientenkollektivs. Dieser Testung (siehe Tab. 12 und Mehrfeldertafel 6) ließen sich folgende zwei Aussagen entnehmen:

1. Die Ausprägung von Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss darauf, ob sich der Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende im oder über dem Normbereich befindet ($p=0,018$; $n=83$).
2. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich der Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende im Normbereich befindet, scheint tendenziell, wenn auch nicht signifikant, in folgender Reihenfolge anzusteigen: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$.

Zweite ungeschichtete Testung: Um den in der zweiten Aussage angedeuteten Einfluss der mono-chromosomalen Allele $(CGG)_7$ und $(CGG)_8$ auf den Serum-GPT-Wert zu erhellen, erfolgte eine weitere Testung (siehe Tab. 13 und Mehrfeldertafel 12), die die folgenden zwei zusätzlichen Feststellungen erlaubte:

- Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_7$ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_8$ – ist signifikant assoziiert mit einem oberhalb des Normbereiches liegenden Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende ($p=0,023$; $n=83$).
- Das bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_8$ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_7$ – ist signifikant assoziiert mit einem innerhalb des Normbereiches liegenden Serum-GPT-Wert 56 Wochen nach Therapieende ($p=0,023$; $n=83$).

Definiert man den Erfolg der Therapie einer CHC über einen im Normbereich befindlichen Serum-GPT-Wert ein Jahr nach Therapieende, so lassen sich die bisher getroffenen Aussagen folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Ausprägung des Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) hat signifikanten Einfluss auf den Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie.
2. Die Wahrscheinlichkeit für Therapieerfolg scheint tendenziell in folgender Reihenfolge anzusteigen: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$.
3. Das bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_8$ – im Gegensatz zum mono- oder bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_7$ – ist signifikant mit Therapieerfolg assoziiert.
4. Das mono- oder bi-chromosomale Vorliegen von $(CGG)_7$ – im Gegensatz zum bi-chromosomalen Vorliegen von $(CGG)_8$ – ist signifikant mit Therapieversagen assoziiert.

Definiert man den Therapieerfolg nicht über einen im Normbereich befindlichen Serum-GPT-Wert sondern über eine Serum-Viruslast, die sich unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Viruslastbestimmungsverfahrens befindet, so werden alle vier oben getroffenen Aussagen tendenziell bestätigt (siehe Mehrfeldertafeln 1 und 13). Dabei ist zu beachten, dass das durch Viruslast charakterisierte Patientenkollektiv eine geringere Fallzahl aufweist als das durch GPT charakterisierte Kollektiv – und dass zur Bestimmung der Viruslast zwei verschiedene Nachweisverfahren mit – wie oben beschrieben – unterschiedlichen unteren Nachweisgrenzen verwendet wurden.

Geschichtete Testung: Die bisher getroffenen Aussagen bezogen sich auf ein ungeschichtetes Kollektiv. Um zu prüfen, ob sich die oben aufgelisteten Aussagen auch in Abhängigkeit von Therapieregime, Virusgenotyp und Geschlecht treffen ließen, wurden die entsprechenden Testungen an einzelnen Kollektivschichten wiederholt (siehe Tab. 15 bis 17).

Die Schichtung anhand der Therapieregime erfolgte, da IFN-Ribavirin-Kombinationstherapien höhere Ansprechraten aufweisen als IFN-Monotherapien. Die zusätzliche Schichtung anhand der Virusgenotypen wurde durchgeführt, da bei gleichem Therapieregime für verschiedene Virusgenotypen unterschiedliche Ansprechraten beobachtet werden.

Sowohl die Schichtung nach Therapieregime, als auch die Schichtung nach Therapieregime und Virusgenotyp bestätigten alle bisher getroffenen Aussagen. Den Aussagen widersprechende Daten lagen in keinem Fall vor (siehe Tab. 16 und 17).

Eine zusätzliche Schichtung nach Geschlecht erfolgte, um zu prüfen, ob zwischen Frauen und Männern bestehenden Unterschiede im Eisenstoffwechsel, einen Einfluss auf die bisher getroffenen Aussagen haben könnten.

Die Testergebnisse der geschlechtsspezifischen Schichten fielen dabei unterschiedlich aus: In allen Männergruppen wurde eine signifikante Assoziation zwischen Polymorphismus-Ausprägung und GPT-definiertem Therapieerfolg beobachtet, während eine solch signifikante Assoziation in keiner der drei Frauengruppen zutage trat.

Inwieweit dieser Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten auf menstruationsbedingte Eisenverluste und eventuelle Folgeeffekte zurückzuführen ist, bleibt jedoch unklar. Ob, wie viele und welche Patientinnen bereits die Menopause erreicht hatten ist ebenso unbekannt wie die angewandten Antikonzeptionsmethoden der nichtmenopausierenden Frauen. Auch weisen die Frauengruppen die kleinsten Fallzahlen aller getesteten Schichten auf; sie sind kleiner als alle nicht geschlechtsspezifischen Schichten und auch kleiner als die ihnen entsprechenden Männergruppen. Angesichts der geringen Fallzahlen und des unklaren Menstruationsstatus ist das Abweichen der Frauengruppentestergebnisse von den Ergebnissen in den anderen Schichten mit Vorsicht zu betrachten.

Ungeschichtete und geschichtete statistische Testung zusammenfassend lässt sich demnach folgendes sagen: Es wurde beobachtet, dass die Ausprägung des Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) einen signifikanten Einfluss auf den GPT-definierten Erfolg einer Interferon-basierten CHC-Therapie hat.

Da es sich bei der Beobachtung dieser Korrelation um eine Erstbeschreibung handelt, wird neben der statistischen Signifikanz auch die pathophysiologische Plausibilität gefordert. Das pathophysiologische Argument lautet wie folgt: Der Verlauf einer chronischen Hepatitis C wird durch hepatischen Eisenüberschuss aggraviert, das Ferroportin-Protein stellt den einzigen zur Zeit bekannten Exporter intrazellulären Eisens dar, der Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) ist Bestandteil der Promotorregion des Ferroportin-Gens oder folgt unmittelbar auf diese; d. h. dass Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) eine Veränderung intrahepatozellulärer Eisenkonzentrationen bewirken und damit den Verlauf einer CHC beeinflussen kann.

Die einzelnen Annahmen des pathophysiologischen Arguments werden im Folgenden näher erläutert.

Hepatische Eisenüberladung aggraviere den CHC-Verlauf

Die Hinweise darauf, dass hepatischer Eisenüberschuss den Verlauf chronischer HCV-Hepatitis aggraviere, sind zahlreich. Parameter hepatischer Eisenüberladung wurden mit verstärkter Entzündungsaktivität (80-82), verstärkter Fibroseentwicklung (80, 81, 83), Hepatokarzinogenese (84, 85), Nichtansprechen auf IFN-Ribavirin-Kombinationstherapie (80) und Nichtansprechen auf IFN-Monotherapie (81, 86-93) korreliert. Eine Meta-Analyse sechs prospektiver, randomisierter, kontrollierter Studien schloss, dass Phlebotomien die

Wahrscheinlichkeit erhöhten, nachhaltiges virales Ansprechen zu erreichen (79). Eisenüberschuss führt zur Verstärkung von oxidativem Stress und somit letztlich zur Lipid-, Protein- und Nukleinsäureschädigung (75, 76). Über zelleigene Proteine scheint Eisen die Translations-Initiation von HCV-RNA zu fördern (97).

Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) könnte Bestandteil des Kernpromotors sein

Eine Beschreibung des Promotors des menschlichen Ferroportin-Gens existiert nicht; allerdings wurden mehrere Promotorelemente beschrieben, deren Lokalisierung den Polymorphismus Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) in oder unmittelbar hinter den Kernpromotor platzieren könnte. Bei diesen Elementen handelt es sich um den Transkriptionsstartpunkt, eine TATA-Box sowie zwei GGGCGG-Boxen.

Transkriptionsstartpunkt und TATA-Box sind typische Bestandteile des so genannten Kernpromotors – jener DNA-Sequenz, die mindestens notwendig ist, um eine präzise Transkriptions-Initiation zu gewährleisten (158). GGGCGG-Boxen wiederum sind oft im proximalen Promotor enthalten, der 5'-wärts des Kernpromotors lokalisiert ist (159).

Vorliegende Untersuchungen zu diesen Promotorelementen des Ferroportin-Gens erfolgten anhand der DNA von Maus und Mensch. Die teils widersprüchlichen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt:

Betrachtet man die 5'-UTR-Sequenzen des Ferroportin-Gens von Maus und Mensch im Vergleich, lassen sich folgende Feststellungen treffen: Von 3'- nach 5'-wärts weisen beide ein IRE (Iron Responsive Element), einen CGG-Repeat, eine TATA-Box sowie zwei GGGCGG-Sequenzen auf. Das N des CGG-Repeats wird beim Menschen mit 7-9 und bei der Maus mit 6 angegeben.

Die das menschliche Gen beschreibenden Publikationen lokalisieren den Transkriptionsstartpunkt drei (100) bzw. fünf (130) Basenpaare hinter dem CGG-Repeat (siehe Abb. 20). Die das Maus-Gen beschreibenden Studien lokalisieren den Transkriptionsstartpunkt sowohl hinter als auch vor dem CGG-Repeat: Die Maus-Gen-Lokalisationen lauten 12 Basenpaare hinter dem CGG-Repeat (100), direkt vor dem CGG-Repeat (160) bzw. 3'-wärts in der Nähe der TATA-Box, die sich 26 Basenpaare vor dem CGG-Repeat befindet (161). In allen vorliegenden Studien wird der Transkriptionsstartpunkt zwischen IRE und TATA-Box und in der Nähe des CGG-Repeats lokalisiert.



Abb. 20: Position von Ferroportin c.1-310 CGG(7) zwischen Promotor-Elementen: menschliche Sequenz
 Kernpromotor-Elemente: TATA-Box, Transkriptionsstartpunkte
 distale Promotor-Elemente: GGGCGG-Boxen

Der Kernpromotor beinhaltet typischerweise den Transkriptionsstartpunkt und dehnt sich meistens etwa 35 Basenpaare stromauf- oder -abwärts von diesem aus (158); die TATA-Box wiederum ist meist circa 25-30 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt lokalisiert (158). Betrachtet man die verschiedenen beschriebenen Transkriptionsstartpunkte des Ferroportin in Bezug auf ihren Abstand zur TATA-Box, so ergibt sich folgendes Bild: die 5'-wärts des CGG-Repeats beschriebenen Transkriptionsstartpunkte befinden sich in dem als typisch beschriebenen Abstand zur TATA-Box (25 Bp). Die 3'-wärts des CGG-Repeats beschriebenen Transkriptionsstartpunkte befinden sich in einem Abstand zur TATA-Box, der größer als angeblich typisch ist: Für den hinter dem CGG-Repeat der Maus (N = 6) angegebenen Transkriptionsstartpunkt beträgt diese Distanz 55 Basenpaare; für die hinter dem CGG-Repeat des Menschen (N mit der höchsten Allelfrequenz = 8) angegebenen Transkriptionsstartpunkte beträgt die Distanz zur TATA-Box 43 bzw. 45 Basenpaare. Auch die angeblich typische Kernpromotorlänge von 35 Basenpaaren wird bei hinter dem CGG-Repeat lokalisierten Transkriptionsstartpunkten um 25, 13 bzw. 15 Basenpaare respektive überschritten. Der Abstand der ersten GGGCGG-Box zum Transkriptionsstart entspricht für alle beschriebenen Transkriptionsstartpunkt-Loci der üblichen Distanz von weniger als 100 Basenpaaren (159); die zweite GGGCGG-Box ist in allen Fällen weiter als 100 Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt entfernt.

Zusammenfassend lässt sich folgendes sagen:

Betrachtet man die Ferroportin-Sequenz der Maus unter Berücksichtigung der für das Maus-Gen veröffentlichten Transkriptionsstartpunkte, so wird der Polymorphismus in die Nähe des Transkriptionsstartpunktes positioniert: entweder unmittelbar hinter ihn oder vor ihn als Bestandteil eines Kernpromotors.

Betrachtet man die Ferroportin-Sequenz des Menschen unter der Berücksichtigung der veröffentlichten menschlichen Transkriptionsstartpunkte, so befindet sich der Polymorphismus c.1-310 CGG(7_9) im Kernpromotor – wenige Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt (siehe Abb. 20).

Die Lokalisierung von Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) in einem anscheinend funktionell relevanten Bereich des Gens spricht dafür, dass ein signifikanter, funktioneller Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Polymorphismus und dem Ansprechen einer CHC-Therapie vorliegt.

Dieser Zusammenhang sollte im Folgenden sowohl statistisch als auch funktionell weitergehend untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die statistische Testung anhand einer größeren Kohorte wiederholt werden. Die Patienten dieser Kohorte sollten die dieser Studie zugrunde liegenden Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen – darüber hinaus wünschenswert wäre die Einheitlichkeit des Therapieregimes in Bezug auf die Dosierung von Ribavirin pro kg Körpergewicht, Fallzahlen, die aussagekräftige statistische Testungen Geschlechts- und Virusgenotyp-spezifischer Untergruppen ermöglichen sowie Bekanntheit des Regelblutungsstatus und der verwendeten Antikonzeptionsmethode.

Neben der Wiederholung der statistischen Testung anhand einer größeren Kohorte sollte auch eine Analyse der Promotoraktivität von Ferroportin in Abhängigkeit von der Ausprägung von c.1-310 CGG(7_9) erfolgen. Diese Untersuchung könnte z. B. mittels eines Luciferase-Assays durchgeführt werden.

Es sollte eine statistische Betrachtung des eventuellen Zusammenhanges zwischen Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) und hepatozytärer Eisenüberladung erfolgen. Hepatozytärer Eisengehalt sollte dabei durch postbiopsische Quantifizierung des hepatozytären Eisengehaltes erfasst werden – und nicht wie in bisherigen Studien lediglich durch Serum-Eisenparameter.

6 Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis C (CHC) kann zu Leberzirrhose und Hepatozellulärem Karzinom führen. Interferon-basierte CHC-Therapien dauern nach derzeitigen Empfehlungen bis zu 72 Wochen, ihre Nebenwirkungen führen oft zur Einschränkung von Lebensqualität und Erwerbsfähigkeit. Therapieerfolgsraten betragen teils nicht mehr als 50 % und lassen sich u. U. erst Monate nach Therapieende beurteilen. Prädiktoren des Therapieansprechens helfen Ärzten bei der Beratung und Patienten bei der Entscheidung über Therapiefortführung oder –abbruch.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass hepatischer Eisenüberschuss den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen einer CHC verschlechtert. Diese Arbeit fragte, ob Ferroportin – der einzig bekannte Exporter intrazellulären Eisens – Polymorphismen aufweist, die Prädiktoren eines CHC-Therapieausgangs sein könnten. Eine Gruppe von 65 Probanden (15 HCV-negativ, 50 HCV-positiv) wurde per Sequenzanalyse auf Polymorphismen hin untersucht. Sequenziert wurden dabei alle Exone, an die Exone angrenzende Intronbereiche, die 5'- und die 3'-UTR. Elf Polymorphismen wurden gefunden, von denen fünf mittels Haplotypenanalyse als haplotypendeterminierend identifiziert wurden. Eine zweite, 200 CHC-Patienten umfassende Gruppe wurde auf das Vorhandensein dieser fünf Polymorphismen hin gescreent. Die Polymorphismen wurden anschließend auf Korrelation mit Surrogatparametern für klinisch relevanten Therapieerfolg hin getestet. Die verwendeten Surrogatparameter waren a) Serum-Viruslast unterhalb der unteren Nachweisgrenze und b) Serum-GPT innerhalb des Normbereiches. Beide Parameter wurden 12 Monate nach Therapieende bestimmt, um so viele Relapser wie möglich auszuschließen. Der vermutlich im Kernpromotor lokalisierte Polymorphismus c.1-310 CGG(7_9) wies eine signifikante Assoziation mit biochemischem Therapieansprechen auf ($p=0,018$; $n=83$) – folgende Reihenfolge der Therapieerfolgswahrscheinlichkeit andeutend: $(CGG)_{7/7} < (CGG)_{7/8} < (CGG)_{8/8}$. Eine zweite Testung ergab, dass das Vorliegen des Allels $(CGG)_7$ – egal ob homo- oder heterozygot – signifikant mit biochemischem Therapieversagen assoziiert war ($p=0,023$; $n=83$). Diese in Bezug auf biochemisches Therapieansprechen getroffenen Aussagen wurden in Bezug auf virales Ansprechen tendenziell bestätigt ($n=70$).

Die Relevanz dieser hier erstbeschriebenen, statistisch signifikanten und pathophysiologisch plausiblen Korrelation zwischen Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) und biochemischem Therapieansprechen Interferon-basierter CHC-Therapie muss in Folgestudien überprüft werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Dienes HP. [Definition and diagnosis of acute and chronic hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 2004;42:705-706.
2. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-770.
3. Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, et al. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A,non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study. *N Engl J Med* 1981;304:989-994.
4. Seeff LB, Zimmerman HJ, Wright EC, et al. A randomized, double blind controlled trial of the efficacy of immune serum globulin for the prevention of post-transfusion hepatitis. A Veterans Administration cooperative study. *Gastroenterology* 1977;72:111-121.
5. Knodell RG, Conrad ME, Ginsberg AL, Bell CJ. Efficacy of prophylactic gamma-globulin in preventing non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1976;1:557-561.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
7. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364.
8. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
9. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:2461-2466.
10. Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:2416-2426.
11. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31:54-60.
12. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 1992;122:281-288.
13. Clarke A, Kulasegaram R. Hepatitis C transmission -- where are we now? *Int J STD AIDS* 2006;17:74-80; quiz 80.
14. Karmochkine M, Carrat F, Valleron AJ, Raguin G. [Transmission modes of hepatitis C virus]. *Presse Med* 1998;27:871-876.

15. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1998;47:1-39.
16. Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control* 1995;23:273-277.
17. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:S106-113.
18. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S99-105.
19. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-2441.
20. Kamili S, Krawczynski K, McCaustland K, Li X, Alter MJ. Infectivity of hepatitis C virus in plasma after drying and storing at room temperature. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:519-524. Epub 2007 Apr 2016.
21. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G847-851.
22. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100.
23. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96-102.
24. Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:279-287.
25. Lang CA, Conrad S, Garrett L, et al. Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection. *J Pain Symptom Manage* 2006;31:335-344.
26. Bialek SR, Terrault NA. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006;10:697-715.
27. Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, et al. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1998;27:1435-1440.
28. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-472.
29. Gordon SC, Bayati N, Silverman AL. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology* 1998;28:562-567.
30. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, et al. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995;346:1051-1055.

31. Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000;47:131-136.
32. Chiba T, Matsuzaki Y, Abei M, et al. Multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 1996;31:552-558.
33. Tanaka H, Tsukuma H, Kasahara A, et al. Effect of interferon therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma and mortality of patients with chronic hepatitis C: a retrospective cohort study of 738 patients. *Int J Cancer* 2000;87:741-749.
34. Sene D, Saadoun D, Limal N, Piette JC, Cacoub P. [Update in Hepatitis C virus associated extrahepatic manifestations]. *Rev Med Interne* 2007;28:388-393. Epub 2006 Nov 2007.
35. Sene D, Limal N, Cacoub P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metab Brain Dis* 2004;19:357-381.
36. Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16:65-73.
37. Ramos-Casals M, Font J. Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:447-455.
38. Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol* 2004;40:341-352.
39. Seeff LB. Dilemma of the natural history of hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:199-201.
40. Cox AL, Netski DM, Mosbrugger T, et al. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005;40:951-958. Epub 2005 Mar 2003.
41. Mosley JW, Operskalski EA, Tobler LH, et al. Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005;42:86-92.
42. Castillo I, Pardo M, Bartolome J, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004;189:7-14. Epub 2003 Dec 2031.
43. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* 2004;78:5867-5874.
44. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:106-114.
45. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol* 2004;44:20-29.
46. Schirmacher P, Fleig WE, Dienes HP. [Biopsy diagnosis of chronic hepatitis]. *Z Gastroenterol* 2004;42:175-185.

47. Schmiegel WH. [Diagnosis and treatment of acute and chronic hepatitis C--procedure in difficult situations]. *Z Gastroenterol* 2004;42:720-723.
48. Burdelski M, Wirth S, Laufs R. [Viral hepatitis in children and adolescence]. *Z Gastroenterol* 2004;42:731-733.
49. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171.
50. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006;130:225-230.
51. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006;130:231-264; quiz 214-237.
52. Glud C, Brok J, Gong Y, Koretz RL. Hepatology may have problems with putative surrogate outcome measures. *J Hepatol* 2007;46:734-742. Epub 2007 Jan 2026.
53. Zeuzem S. [Standard treatment of acute and chronic hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 2004;42:714-719.
54. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1043-1054.
55. Berg T. Tailored treatment for hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2008;12:507-528.
56. Sjogren MH, Sjogren R, Jr., Lyons MF, et al. Antiviral response of HCV genotype 1 to consensus interferon and ribavirin versus pegylated interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci* 2007;52:1540-1547. Epub 2007 Apr 1544.
57. Cornberg M, Hadem J, Herrmann E, et al. Treatment with daily consensus interferon (CIFN) plus ribavirin in non-responder patients with chronic hepatitis C: a randomized open-label pilot study. *J Hepatol* 2006;44:291-301. Epub 2005 Nov 2028.
58. Leevy CB. Consensus interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who were nonresponders to pegylated interferon alfa-2b and ribavirin. *Dig Dis Sci* 2008;53:1961-1966. Epub 2008 Jan 1925.
59. Kang H, Lok AS. Endpoints for clinical trials on treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2006;45:473-475. Epub 2006 Jul 2025.
60. European Association for the Study of the Liver. International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999;30:956-961.
61. National Institutes of Health. NIH 2002 Consensus Development Conference on Hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:3-120.
62. Boyer N, Marcellin P. Natural history of hepatitis C and the impact of anti-viral therapy. *Forum (Genova)* 2000;10:4-18.

63. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 1986;315:1575-1578.
64. Davis G, Balart L, Schiff E, al. e. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1989;321:1501-1506.
65. Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:80-87.
66. Eguchi Y, Mizuta T, Yasutake T, et al. High serum leptin is an independent risk factor for non-response patients with low viremia to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:556-560.
67. Males S, Gad RR, Esmat G, et al. Serum alpha-foetoprotein level predicts treatment outcome in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2007;12:797-803.
68. Zekri AR, Haleem HA, Esmat GE, et al. Immunomodulators, sFas and Fas-L as potential noninvasive predictors of IFN treatment in patients with HCV genotype-4. *J Viral Hepat* 2007;14:468-477.
69. Lebray P, Zylberberg H, Hue S, et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004;11:175-182.
70. Distant S, Bjoro K, Hellum KB, et al. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 2002;22:269-275.
71. Sagir A, Heintges T, Akyazi Z, Oette M, Erhardt A, Haussinger D. Relapse to prior therapy is the most important factor for the retreatment response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2007;27:954-959.
72. Fishbein DA, Lo Y, Netski D, Thomas DL, Klein RS. Predictors of hepatitis C virus RNA levels in a prospective cohort study of drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:471-476.
73. Missiha S, Heathcote J, Arenovich T, Khan K. Impact of Asian Race on Response to Combination Therapy With Peginterferon Alfa-2a and Ribavirin in Chronic Hepatitis C.
74. Snoeck E, Wade JR, Duff F, Lamb M, Jorga K. Predicting sustained virological response and anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:699-709.
75. Alla V, Bonkovsky HL. Iron in nonhemochromatotic liver disorders. *Semin Liver Dis* 2005;25:461-472.
76. Fujita N, Takei Y. Iron, hepatitis C virus, and hepatocellular carcinoma: iron reduction preaches the gospel for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2007;42:923-926.

77. Shan Y, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Association of hepatitis C virus infection with serum iron status: analysis of data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Infect Dis* 2005;40:834-841. Epub 2005 Feb 2021.
78. Bassett ML. Iron and hepatitis C: beginning to make sense. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1703-1704.
79. Desai TK, Jamil LH, Balasubramaniam M, Koff R, Bonkovsky HL. Phlebotomy Improves Therapeutic Response to Interferon in Patients with Chronic Hepatitis C: A Meta-Analysis of Six Prospective Randomized Controlled Trials. 2007.
80. Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, et al. Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1886-1893.
81. Ikura Y, Morimoto H, Johmura H, Fukui M, Sakurai M. Relationship between hepatic iron deposits and response to interferon in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1367-1373.
82. Fabris C, Toniutto P, Scott CA, et al. Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2001;304:49-55.
83. Saito H, Fujimoto Y, Ohtake T, et al. Up-regulation of transferrin receptor 1 in chronic hepatitis C: Implication in excess hepatic iron accumulation. *Hepatol Res* 2005;31:203-210.
84. Furutani T, Hino K, Okuda M, et al. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 2006;130:2087-2098.
85. Tanaka H, Fujita N, Sugimoto R, et al. Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Br J Cancer* 2008;98:580-586. Epub 2008 Jan 2029.
86. Pianko S, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Hepatic iron concentration does not influence response to therapy with interferon plus ribavirin in chronic HCV infection. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:483-489.
87. Piperno A, Sampietro M, D'Alba R, et al. Iron stores, response to alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 1996;16:248-254.
88. Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995;108:1104-1109.
89. Barton AL, Banner BF, Cable EE, Bonkovsky HL. Distribution of iron in the liver predicts the response of chronic hepatitis C infection to interferon therapy. *Am J Clin Pathol* 1995;103:419-424.
90. Akiyoshi F, Sata M, Uchimura Y, Suzuki H, Tanikawa K. Hepatic iron stainings in chronic hepatitis C patients with low HCV RNA levels: a predictive marker for IFN therapy. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1463-1466.

91. Martin-Vivaldi R, Nogueras F, Gonzalez A, et al. Response of chronic hepatitis C to interferon-alpha treatment and relationship with iron metabolism. *Rev Esp Enferm Dig* 1997;89:523-530.
92. Fargion S, Fracanzani AL, Sampietro M, et al. Liver iron influences the response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:497-503.
93. Perez R, Pravia R, Artimez ML, et al. A comparison between two induction regimes for the interferon treatment of chronic hepatitis C. Response related factors. *Rev Esp Enferm Dig* 1997;89:159-173.
94. Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004;53:451-455.
95. Guyader D, Thirouard AS, Erdtmann L, et al. Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:587-595. Epub 2006 Nov 2010.
96. Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 2008;134:226-238. Epub 2007 Oct 2009.
97. Cho H, Lee HC, Jang SK, Kim YK. Iron increases translation initiation directed by internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *Virus Genes* 2008;37:154-160. Epub 2008 Jun 2020.
98. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000;403:776-781.
99. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000;5:299-309.
100. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275:19906-19912.
101. Haile DJ. Assignment of Slc11a3 to mouse chromosome 1 band 1B and SLC11A3 to human chromosome 2q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:328-329.
102. De Domenico I, Ward DM, Nemeth E, et al. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8955-8960. Epub 2005 Jun 8913.
103. Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* 2005;12:107-111.
104. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 2007;20:665-674. Epub 2007 Feb 2002.
105. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-2093. Epub 2004 Oct 2028.

106. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-7810. Epub 2000 Dec 7 11.
107. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461-2463. Epub 2002 Nov 24 14.
108. Vyalov D, Petrak J. Heparin: A direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1768-1773. Epub 2005 Mar 17 16.
109. McKie AT, Barlow DJ. The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1). *Pflugers Arch* 2004;447:801-806. Epub 2003 Jun 20 27.
110. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1324-1328. Epub 2005 Jan 13 21.
111. Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI. Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J Biol Chem* 1995;270:24209-24215.
112. Cazzola M, Cremonesi L, Papaioannou M, et al. Genetic hyperferritinemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (SLC11A3). *Br J Haematol* 2002;119:539-546.
113. Devalia V, Carter K, Walker AP, et al. Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood* 2002;100:695-697.
114. Montosi G, Donovan A, Totaro A, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619-623.
115. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001;28:213-214.
116. Roetto A, Merryweather-Clarke AT, Daraio F, et al. A valine deletion of ferroportin 1: a common mutation in hemochromatosis type 4. *Blood* 2002;100:733-734.
117. Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, et al. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood* 2002;100:692-694.
118. Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:725-732.
119. Hetet G, Devaux I, Soufir N, Grandchamp B, Beaumont C. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11a3) mutations. *Blood* 2003;102:1904-1910. Epub 2003 May 19 01.
120. Cremonesi L, Forni GL, Soriani N, et al. Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *Br J Haematol* 2005;131:663-670.

121. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:72-81.
122. Wallace DF, Subramaniam VN. Non-HFE haemochromatosis. *World J Gastroenterol* 2007;13:4690-4698.
123. Alphey L. DNA-Sequenzierung. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag, 1998.
124. Barr PJ, Thayer RM, Laybourn P, Najarian RC, Seela F, Tolan DR. 7-Deaza-2'-Deoxyguanosine-5'-Triphosphate: Enhanced Resolution in M13 Dideoxy Sequencing. *BioTechniques* 1986;4:428.
125. Mizusawa S, Nishimura S, Seela F. Improvement of the Dideoxy Chain Termination Method of DNA Sequencing by Use of Deoxy-7-Deazaguanosine Triphosphate in Place of dGTP. *Nucleid Acids Res.* 1986;14:1319-1324.
126. Tabor C, Richardson CC. DNA Sequence Analysis with a Modified Bacteriophage T7 DNA Polymerase. Effect of Pyrophosphorolysis and Metal Ions. *J. Biol. Chem.* 1990;265:8322-8328.
127. Qiagen. DyeEx™ Handbook For DyeEx™ 2.0 Spin Kit, 2002.
128. Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol* 2003;39:710-715.
129. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network.
130. Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Felitti V, Beutler E. A study of genes that may modulate the expression of hereditary hemochromatosis: transferrin receptor-1, ferroportin, ceruloplasmin, ferritin light and heavy chains, iron regulatory proteins (IRP)-1 and -2, and hepcidin. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:783-802.
131. Carithers RL, Jr., Emerson SS. Therapy of hepatitis C: meta-analysis of interferon alfa-2b trials. *Hepatology* 1997;26:83S-88S.
132. Chemello L, Cavalletto L, Casarin C, et al. Persistent hepatitis C viremia predicts late relapse after sustained response to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *TriVeneto Viral Hepatitis Group. Ann Intern Med* 1996;124:1058-1060.
133. Hui CK, Belaye T, Montegrando K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517.
134. Persico M, Persico E, Suozzo R, et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2000;118:760-764.
135. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Cazals-Hatem D, et al. Prospective study on anti-hepatitis C virus-positive patients with persistently normal serum alanine transaminase with or without detectable serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology* 2001;34:1000-1005.

136. Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000;343:1673-1680.
137. Perrillo RP. The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:57S-61S.
138. De Moliner L, Pontisso P, De Salvo GL, Cavalletto L, Chemello L, Alberti A. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features. *Gut* 1998;42:856-860.
139. Coelho-Little E, Jeffers LJ, Bartholomew M, Reddy KR, Schiff ER, Dailey PJ. Correlation of HCV-RNA levels in serum and liver of patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1995;22:508.
140. Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C. Detection and quantification of hepatitis C virus RNA replication in the liver. *J Hepatol* 1994;20:593-597.
141. McGuinness PH, Bishop GA, Painter DM, Chan R, McCaughan GW. Intrahepatic hepatitis C RNA levels do not correlate with degree of liver injury in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:676-687.
142. Persico M, Perrotta S, Persico E, et al. Hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels: biological peculiarities and update of the natural history of liver disease at 10 years. *J Viral Hepat* 2006;13:290-296.
143. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97-104.
144. Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998;27:868-872.
145. Wali M, Lewis S, Hubscher S, et al. Histological progression during short-term follow-up of patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1999;6:445-452.
146. Pradat P, Alberti A, Poynard T, et al. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology* 2002;36:973-977.
147. Wilson LE, Torbenson M, Astemborski J, et al. Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;43:788-795.
148. Collier JD, Woodall T, Wight DG, Shore S, Gimson AE, Alexander GJ. Predicting progressive hepatic fibrosis stage on subsequent liver biopsy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005;12:74-80.
149. Colletta C, Smirne C, Fabris C, et al. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005;42:838-845.
150. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-832.

151. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2003;2:5-11.
152. Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006;44:729-737.
153. Sawyer L., Leung K., Friesenhahn M., Duey D., McMorrow M., B. E. Clinical laboratory evaluation of a new sensitive and specific assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA in clinical specimens. *Journal of Hepatology* 2000;32:116.
154. Gourelain K, Soulier A, Pellegrin B, et al. Dynamic range of hepatitis C virus RNA quantification with the Cobas Ampliprep-Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:1669-1673.
155. Mangia A, Antonucci F, Brunetto M, et al. The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Dig Liver Dis* 2008;40:395-404. Epub 2008 Mar 2005.
156. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S65-73.
157. Tobler LH, Stramer SL, Lee SR, et al. Performance of ORTHO HCV core antigen and trak-C assays for detection of viraemia in pre-seroconversion plasma and whole blood donors. *Vox Sang* 2005;89:201-207.
158. Butler JE, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 2002;16:2583-2592.
159. Todd AK, Neidle S. The relationship of potential G-quadruplex sequences in cis-upstream regions of the human genome to SP1-binding elements. *Nucleic Acids Res* 2008;36:2700-2704. Epub 2008 Mar 2719.
160. Liu XB, Hill P, Haile DJ. Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:315-326.
161. Mok H, Jelinek J, Pai S, et al. Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development* 2004;131:1859-1868.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALA	Alanin
ASN	Asparagin
ASP	Aspartinsäure
BfaI	Enzym BfaI aus Bacteroides fragilis
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin, Cystein
c.	coding DNA
cDNA	coding DNA
CHC	Chronische Hepatits C
CIFN	Consensus Interferon
D	Asparaginsäure
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEL	Deletion
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dITP	Desoxyinosintriphosphat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETR	End of Treatment Response
EVR	Early Viral Response
FPN1	Ferroportin1
g	Gramm
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

Gamma-GT	Gamma-Glutamyltransferase
GLN	Glutamin
GLY	Glycin
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
H	Histidin
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
HBs-Ag	Hepatitis-B-surface-Antigen
HC	Hepatitis C
HCV	Hepatitis C-Virus
he	heterozygot
HIS	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HJV	Haemojuvelin
ho	homozygot
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HpyCH4IV	Enzym HpyCH4IV aus Helicobacter pylori CH4
IFN	Interferon
IFN α	Interferon alpha
IRE	Iron Responsive Element
IREG1	Iron Regulated Transporter 1
IRP	Iron Regulatory Protein
IU	International Unit
IVS	Invariant Sequence
kg	Kilogramm
MboI	Enzym MboI aus Moraxella bovis
min.	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MTP1	Metal Transporter Protein 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PEG	pegyliert
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii
PM	Polymorphismus
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
RsaI	Enzym Rsa 1 aus <i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>
rs-Nummer	Reference SNP Nummer
sec.	Sekunde
SLC	Solute Carrier Family
SLC11A3	Solute Carrier Family 11, Member A3
SLC40	Solute Carrier Family 40
SLC40A1	Solute Carrier Family 40, Member A1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SVR	Sustained Viral Response
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TFR2	Transferrin Rezeptor 2
TSR	Template Suppression Reagent
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAL	Valin
wt	Wildtyp
XmnI	Enzym XmnI aus <i>Xanthomonas manihotis</i> 7AS1
Y	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Anhang

9.1 Danksagung

Hier sei all denen gedankt, die diese Arbeit ermöglicht haben!

Allen Patienten, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben, und ohne die nichts möglich gewesen wäre, möchte ich für ihr Vertrauen besonders danken.

Prof. Dr. med. Herbert Lochs danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in seiner Abteilung.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Hartmut H.-J. Schmidt, danke ich für die Überlassung des Themas und seine stets wohlwollende, großzügige und anregende fachliche Förderung.

Besonderer Dank und äußerste Wertschätzung gelten Dr. rer. nat. Janine Büttner für eine außergewöhnliche Betreuung. Ohne ihre kompetente, stets geduldige und freundlich-bestärkende Anleitung, ohne ihr für Fragen allzeit offenes Ohr und ohne ihre klaren und anregenden Antworten und Kommentare wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Meinen allerherzlichsten Dank!

Für zahlreiche praktische Hilfestellungen beim Erlernen des Experimentierens und eine herzliche und unterstützende Aufnahme in die Arbeitsgruppe danke ich Bettina Bochow und Renita Weltrich.

Dr. med. Stephan Kaiser, Dr. med. Holger G. Hass und ihren Mitarbeitern danke ich für den großzügigen Zugang zu Labordaten und für die Überlassung von Blutproben des von ihnen betreuten Patientenkollektivs.

Dr. Katja Frieler und Tania Schink vom Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité danke ich für die Einführung in die Handhabung von SPSS und die kritische Prüfung der in dieser Arbeit angewendeten statistischen Methoden und der aus den Testergebnissen gezogenen Schlüsse.

Nicht zuletzt möchte ich allen Freunden danken, die mir Mut machend über schwierige Phasen der Arbeit hinweggeholfen haben.

Meinen Eltern, deren Zuspruch und Geduld Voraussetzung waren, diese Arbeit beginnen und durchführen zu können, kann ich nicht genug danken.

9.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9.3 Publikationsliste

Ellermeyer T, Büttner J, Kaiser S, Hass H G, Gentz E, Fiedler T, Bochow B, Weltrich R, Lochs H, Schmidt H. Ferroportin c.1-310 CGG(7_9) as potential predictor for the treatment response in hepatitis C. *Hepatology* 2008;48(S1):1096A

9.4 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Tonio Ellermeyer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Ferroportins bei chronischer Hepatitis C“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

14.04.2009

Unterschrift