

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

**Genetische Untersuchungen des *ISG15*-Promotors in der
Hepatitis-C-Virus Infektion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin

Dr. rer. medic.

durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Olessja Pankraz

aus Schachtinsk, Kasachstan

2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J.F. Schlaak
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. K. Lang
3. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. S. Ciesek

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2016

<u>Inhaltsverzeichnis:</u>	3
I Einleitung:	5
I.1 Hepatitis-C-Virus	5
I.2 Genomorganisation und virale Proteine von Hepatitis-C-Virus	5
I.3 Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus	6
I.4 Antivirale Therapie bei HCV-Infektion	6
I.4.1 Unterschiedliche Ansprechtypen von HCV-Patienten auf die antivirale Therapie	8
I.5 Interferone	8
I.5.1 Interferon stimulierten Gene (<i>ISGs</i>)	9
I.6 ISG15 und der ISGylierungsprozess	9
I.6.1 biologische Funktionen von ISG15	11
I.6.2 Differentielle Genexpression von <i>ISG15</i> und weiteren <i>ISGs</i> in der Leber von HCV-Patienten	12
I.6.3 ISG15, ein stimulierender Faktor für den HCV-Lebenszyklus	12
I.6.4 Zelltypspezifische Expression des ISG15-Proteins in der Leber von HCV-Patienten	12
I.7 Regulationsmechanismen der Genexpression	13
I.7.1 Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)	13
I.7.2 Methylierung von CpG-Dinukleotiden	14
I.7.3 miRNA und ihre Biogenese	14
I.7.3.1 miRNA-122 stimuliert die HCV-Translation	16
I.8 Zielsetzung der Arbeit	16
II Material und Methoden:	18
II.1. Chemikalien	18
II.1.1 Chemikalien und Reagenzien	18
II.1.2 Verwendete Kits/Sets	18
II.2 Verbrauchsmaterial	19
II.3 Verwendete Geräte	19
II.4 Verwendete Internetseiten, Software und Programme	20
II.5 Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen im humanen <i>ISG15</i> -Promotorbereich	20
II.5.1 Suche nach SNPs in der <i>ISG15</i> -Promotorregion	20
II.5.2 Patienteninformation	21
II.5.2.1 SNP-Analyse im <i>ISG15</i> -Promotor bei einer kleinen Probanden- und Patientenanzahl	21
II. 5.2.2 SNP-Analyse im <i>ISG15</i> -Promotor bei einer größeren Probanden- und Patientenanzahl	22
II.5.3 Isolierung der genomischen DNA aus peripheren Blutmonozyten (PBMC)	23
II.5.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	23
II.5.5 Polymerase-Kettenreaktion	23
II.5.6 Agarose-Gelelektrophorese	25
II.5.7 Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen mit der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode (RFLP)	26
II.5.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	28
II.5.9 konventionelle DNA-Sequenzierung	28
II.6 Genetische Untersuchungen von SNPs und CpG-Dinukleotiden im humanen <i>ISG15</i> -Promotor mittels Pyrosequenzierung	28
II.6.1 Untersuchung von SNPs mit Pyrosequenzierung	29
II.6.2 Untersuchung von CpG-Dinukleotiden mit Pyrosequenzierung	32
II.7 Zellkultur	35
II.7.1 Kultivierung der humanen Con1-Zelllinie	35
II.7.2 Suppression der Genexpression (RNA-Interferenz)	35
II.7.2.1 Ansetzen der RNA-Stammlösungen	35
II.7.2.2 Transfektion von Con1-Zellen mit <i>Lipofectamin</i> TM 2000/ <i>Lipofectamin</i> TM RNAiMAX	36

II.7.3 RNA und miRNA-Aufreinigung (Isolierung)	37
II.7.4 Nachweis von mRNA mit quantitativer <i>real-time</i> RT-PCR	37
II.8 Statistische Analyse	39
III Ergebnisse:	40
III.1 Untersuchung von SNPs im humanen <i>ISG15</i> -Promotorbereich	40
III.1.1 Genotypisierung der SNPs mit der RFLP-Methode	41
III.1.1.1 Genotypisierung von SNP rs2341365 [A/G] mittels RFLP	41
III.1.1.2 Zusammenfassung der Genotypisierung aller SNPs mit der RFLP-Methode	43
III.1.2 Genotypisierung der SNPs mit konventioneller Sequenzierung	45
III.1.2.1 Genotypisierung von SNP rs4615788 [C/G] mittels konventioneller Sequenzierung	45
III.1.2.2 Zusammenfassung der Genotypisierung aller SNPs mit konventioneller Sequenzierung	47
III.1.3 Genotypisierung von SNP rs60637872 [CAA/-] mit zwei unterschiedlichen Sequenzierungs-Methoden	48
III.1.3.1 Untersuchung von SNP rs60637872 mit der konventionellen Sequenzierung	48
III.1.3.2 Untersuchung von SNP rs60637872 mit der Pyrosequenzierung	50
III.1.3.3 Zusammenfassung der Genotypisierung von SNP rs60637872	54
III.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aller SNPs bei der kleinen Probanden- und Patientenanzahl	54
III.2. Genotypisierung von SNP rs60637872 in einer größeren Kohorte von HCV-Patienten mittels Pyrosequenzierung	55
III.3 Analyse der DNA-Methylierung im humanen <i>ISG15</i> -Promotor mittels Pyrosequenzierung	59
III.3.1 CpG 3'-up-Test zur Analyse der DNA-Methylierung im humanen <i>ISG15</i> -Promotor	59
III.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Methylierung im humanen <i>ISG15</i> -Promotor	64
III.4 <i>In vitro</i> Untersuchung des Zusammenhanges zwischen <i>ISG15</i> und miRNA-122 bei der HCV-Replikation	68
III.4.1 Einfluss von miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff auf die HCV-Replikation und <i>ISG15</i> -Genexpression in Con1-Zellen	68
III.4.2 Kombinierte Suppression von <i>ISG15</i> und miRNA-122 und dessen Effekt auf die HCV-Replikation in Con1-Zellen	70
IV Diskussion:	73
IV.1 Genotypisierung von SNPs in der Norm- und HCV-Patienten-Kohorte	73
IV.2 Analyse der DNA-Methylierung im humanen <i>ISG15</i> -Promotor von HCV-Patienten	79
IV.3 <i>In vitro</i> Untersuchung des Zusammenhanges zwischen <i>ISG15</i> und miRNA-122 bei der HCV-Replikation	82
V Zusammenfassung	86
VI Literaturverzeichnis	87
VII Abkürzungsverzeichnis	97
VIII Danksagung	99
Lebenslauf	100

I Einleitung:

I.1 Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde erstmals 1989 identifiziert (Choo Q.L. et al., 1989) und ist eine der weltweit häufigsten Ursachen für eine chronische Lebererkrankung (Lavanchy. D., 2011). Nach Angaben der Weltgesundheits-organisation (WHO, *World Health Organization*) sind 3% der weltweiten Weltbevölkerung somit über 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert (Poynard T. et al., 2003), schätzungsweise sind etwa 500.000 Menschen in Deutschland betroffen (Angaben des Robert Koch Instituts, 2009).

Bei Hepatitis-C-Virus handelt es sich um ein Virus, das der Gattung Hepacivirus und der Familie der Flaviviridae zugeordnet wird (Thiel H.J. et al., 2005). Derzeit unterscheidet man sechs HCV-Genotypen (1 bis 6), von denen zahlreiche Subtypen (1a, 1b usw.) charakterisiert sind (Simmonds P. et al., 2005). Des Weiteren können sich aufgrund der Leseungenauigkeit der viralen RNA-Polymerase bei einer HCV-Infektion im Wirt weitere Abweichungen von der ursprünglichen Nukleotidsequenz entwickeln und sogenannte Quasispezies entstehen.

I.2 Genomorganisation und virale Proteine von Hepatitis-C-Virus

HCV ist ein behülltes Virus, dessen Hülle sich aus zwei viralen Oberflächenproteinen E1 und E2 (E, *envelope*) zusammensetzt (Deleersnyder V. et al., 1997). Über diese Proteine werden die Anheftung und das Eindringen des HCV über zelluläre Rezeptoren in die Leberzellen, die Hepatozyten vermittelt. Im Inneren der Hüllmembran befindet sich eine Kapsid-ähnliche Struktur, welche aus einem Polymer eines einzigen Kernproteins, dem Core-Protein besteht. An dieses Core-Protein ist das positive Einzelstrang-RNA-Genom angelagert, das eine Länge von ungefähr 9,6 kb aufweist. Das HCV-Genom besteht aus einem offenen Leserahmen, ORF (*open reading frame*), das für ein einziges Polyprotein kodiert und durch 5'- und 3' untranslatierte Regionen (UTR, *untranslated region*) flankiert ist. Die 5'-UTR weist eine, zur Initiation der Translation spezifische Struktur, die IRES-Sequenz (IRES, *internal ribosome entry site*) auf, welche für die virale Translation bedeutsam ist (Foy E. et al., 2005). Beide UTRs spielen auch eine regulatorische Rolle bei der HCV-Replikation.

Das virale Polyprotein wird bereits während der Translation in zehn verschiedene virale Proteine gespalten (Bartenschlager R., Lohmann V., 2000). Bei den ersten drei viralen Proteinen handelt es sich um sogenannte Strukturproteine, dazu gehören das Core-Protein und die beiden Hüllproteine E1 und E2 (Delaney W.E., 2013). Die anderen sieben Proteine sind virale funktionelle Proteine wie p7-Protein, NS2 (NS, Nicht-strukturell), NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Delaney W.E.,

2013). Das p7-Protein ist ein membrangebundenes Protein, das möglicherweise als Ionen-Kanal fungiert (Griffin S.D. et al., 2004). NS2 weist dagegen eine Funktion als Autoprotease auf und ist am viralen Zusammenbau beteiligt (Grakoui A. et al., 1993; Jones C.T. et al., 2007). NS3 ist sowohl eine Serin-Protease, die zusammen mit NS4A das Polyprotein nach der Translation in die einzelnen Proteine spaltet (Lindenbach B.D., Rice C.M., 2005) als auch anhand ihrer Helikase-Aktivität an der HCV-Replikation beteiligt. Die Proteine NS4B und NS5A spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Replikation der viralen RNA. NS5A ist ein Phosphoprotein mit einer RNA-Bindefähigkeit und ist eine wichtige Komponente des viralen Replikationskomplexes (Appel N. et al., 2006). Das letzte der Nicht-Strukturproteine ist das NS5B. Dieses Protein ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, welche die Replikation des RNA-Genoms katalysiert (Lohmann V. et al., 1997; Delaney W.E., 2013).

I.3 Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus

Die HCV-Infektion wird in zwei Phasen unterteilt. In der meist asymptomatischen akuten Phase heilen 20-30% der mit HCV infizierten Personen spontan aus. Die Mehrzahl der Patienten (70-80%) bilden eine chronische Infektion aus (Seeff L.B, 2002; Asselah T. et al., 2009). Der Grund für die chronische Infektion liegt wahrscheinlich an einer mangelnden immunologischen Abwehrreaktion, die während der akuten Phase die Virusvermehrung in der Leber nicht ausreichend hemmen kann (Poynard T. et al., 2003). Aufgrund der hohen Heterogenität des HCV kann das Immunsystem das Virus besser oder schlechter erkennen. Wenn die Erkrankung unbehandelt bleibt, ist das Endstadium des chronischen Verlaufes meist eine Leberzirrhose, aus der sich ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln kann.

I.4 Antivirale Therapie bei HCV-Infektion

Die Behandlung der akuten und chronischen HCV-Infektion mit einem der sechs Genotypen ist unterschiedlich umfangreich. Grundsätzlich wird bei der akuten Hepatitis aller Genotypen eine Monotherapie mit pegyliertem Interferon- α (pegIFN- α) für 24 Wochen empfohlen. Bei einer chronischen HCV-Infektion muss bei der antiviralen Therapie unbedingt der Genotyp berücksichtigt werden, da die einzelnen HCV-Genotypen sich hinsichtlich ihres Therapieansprechens unterscheiden. Die Genotypen 1 und 4 sind am schwersten therapierbar.

Aktuell stehen für Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung, eine Dualtherapie mit pegIFN- α + Ribavirin (RBV), eine Tripletherapie bestehend aus pegIFN- α + RBV + viralen Inhibitor, dem sogenannten DAA (*direct-acting antiviral agent*) oder eine Dualtherapie mit zwei verschiedenen DAAs (Sarrazin C. et al., 2015). Die Dualtherapie

mit pegIFN- α + RBV stellte von 2002 bis 2013 die bisherige Standardbehandlung bei einer chronischen HCV-Infektion dar. Allerdings zeigte diese Behandlung bei vielen HCV-Patienten ein unzureichendes virologisches Ansprechen mit einer langen Therapiedauer, die von starken Nebenwirkungen begleitet war (Fried et al., 2002). Mit der kürzlich erfolgten Zulassung von mehreren DAAs kommt es zu neuen Therapieoptionen, die eine Verbesserung der Ansprechrates (SVR, *sustained virological response*), Verkürzung der Therapiedauer ermöglichen und weniger Nebenwirkungen zeigen als die bisherige Standardtherapie. Allerdings ist die Behandlung mit den neuen DAAs noch sehr kostenintensiv. Bei den zugelassenen DAAs handelt es sich, um NS3/4A-(Protease)-Inhibitoren wie Telaprevir (Incivo®), Boceprevir (Victrelis®) und Simeprevir (Olysio®), NS5A-Inhibitoren wie Daclatasvir (Daklinza®) und Ledipasvir und NS5B-(RNA-Polymerase)-Inhibitor (Harvoni®), Sofosbuvir (Sovaldi®).

Entsprechend der HCV-Leitlinien können zur Behandlung des HCV-Genotyp 1 aktuell mehrere Therapieoptionen empfohlen werden, die eine hohe Effektivität gezeigt haben (Sarrazin C. et al., 2015). Bei dieser Patientenkohorte wird im Allgemeinen mit einer zwölf-wöchigen Behandlung mit pegIFN- α + RBV + Sofosbuvir ein hohes virologisches Ansprechen erzielt. Bei HCV-Patienten mit einer IFN-Unverträglichkeit oder Kontraindikationen wird dagegen der Einsatz von Sofosbuvir + Simeprevir oder Sofosbuvir + Daclatasvir mit oder ohne RBV für zwölf Wochen empfohlen. Für HCV-GT2-Patienten wird grundsätzlich die Dual-Therapie mit pegIFN- α + RBV oder eine Therapie mit Sofosbuvir + RBV empfohlen. Da die HCV-Patienten mit Genotyp 2 unter der Behandlung mit pegIFN- α + Ribavirin eine Ansprechrates von 70-90% erreichen, bleibt in Anbetracht dieser hohen Ansprechrates die Therapieform für diese Kohorte weiterhin als Standardtherapie erhalten, die in der Regel eine Dauer von 24 Wochen hat (Fried et al., 2002). Im Fall von IFN-Unverträglichkeit wird allerdings die IFN-freie Behandlung mit Sofosbuvir + RBV bei einer Therapiedauer von zwölf Wochen empfohlen. Bei HCV-GT3-Patienten kann aufgrund der IFN-Verträglichkeit zwischen folgenden Therapieoptionen gewählt werden: Dual-Therapie mit pegIFN- α + RBV für 24 Wochen, Tripletherapie mit pegIFN- α + RBV + Sofosbuvir für zwölf Wochen oder IFN-freie Dual-Therapie mit Sofosbuvir + RBV für 24 Wochen. Für HCV-GT4-Patienten gilt allgemein die Empfehlung eine Therapie mit pegIFN- α + RBV + Sofosbuvir für zwölf Wochen einzuleiten, die bisher eine hohe SVR-Rate von 96% zeigte. Des Weiteren wurde eine hohe Wirksamkeit von Simeprevir bei HCV-GT4 nachgewiesen. Da nur wenige Ergebnisse zur IFN-freien Behandlung mit Sofosbuvir + Simeprevir bei GT4 vorliegen, kann in dringenden Fällen entsprechend der Empfehlung für HCV-GT1-Patienten verfahren werden. Bei den in westlichen Ländern seltenen Genotypen 5 und 6, zu denen wenige publizierte Daten vorhanden sind, wird im Allgemeinen eine zwölf-wöchige Triple-Therapie bestehend aus pegIFN- α + RBV + Sofosbuvir empfohlen, da diese Therapie eine hohe Wirksamkeit zeigte. Bei HCV-GT5- und HCV-

GT6-Patienten mit einer IFN-Unverträglichkeit kann als einzige IFN-freie Therapieoption die Behandlung mit Sofosbuvir + RBV für zwölf oder 24 Wochen durchgeführt werden.

I.4.1 Unterschiedliche Ansprechtypen von HCV-Patienten auf die antivirale Therapie

Die HCV-Patienten unterscheiden sich aufgrund ihres Therapieansprechens und werden aufgrund des unterschiedlichen Krankheitsverlaufs folgendermaßen definiert: HCV-Patienten, die während der antiviralen Therapie und auch 24 Wochen nach Therapieende ein dauerhaftes klinisches Ansprechen zeigen, indem bei ihnen die HCV-RNA im Serum nicht mehr nachweisbar ist, werden als Responder (SVR, *sustained virological response*) bezeichnet. Das Erreichen von SVR stellt das Ziel der Therapie dar, weil das einer Heilung der chronischen HCV-Infektion entspricht. Sollte nach 24 Wochen nach Beenden der Therapie ein erneuter Anstieg der HCV-RNA im Serum nachgewiesen werden, zählen die HCV-Patienten zu den „Relapsern“ (Poynard T. et al., 2003). Bei den sogenannten „Non-Respondern“ (NR) bleibt die antivirale Therapie wirkungslos (Poynard T. et al., 2003).

I.5 Interferone

Im Rahmen einer starken Aktivierung des Immunsystems (wie z.B. der HCV-Infektion) kommt es zur Produktion von speziellen Proteinen, den Interferonen (IFN). Interferone sind Zytokine und werden hauptsächlich von Fibroblasten und Leukozyten gebildet. Diese Zytokine werden in drei Klassen, Typ-I, Typ-II und Typ-III eingeteilt. Zu Typ-I-Interferonen werden IFN- β , IFN- κ , IFN- ϵ , IFN- ω , IFN- τ , IFN- δ und zahlreiche Subtypen des IFN- α gezählt (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008). IFN- α wird beispielsweise aufgrund seiner immunstimulierenden Wirkung zur Behandlung von Hepatitis B und C eingesetzt und IFN- β kommt bei der Therapie der Multiplen Sklerose (MS) zum Einsatz, indem es immunmodulierend auf das zentrale Nervensystem (ZNS) wirkt. Die Gruppe der Typ-II-Interferone enthält nur IFN- γ als einzigen Vertreter, welches eine immunstimulierende Wirkung gegen unterschiedliche Pathogene vermittelt (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008). Im Gegensatz zu den anderen Interferonen ist bisher wenig über die Klasse der Typ-III-Interferone bekannt, die nur drei Genprodukte des IFN- λ (nach der neuen Nomenklatur: IFNL2 (IL-28A), IFNL3 (IL-28B) und IFNL1 (IL-29)) beinhaltet (Schoggins J.W., Rice C.M., 2011).

Die Produktion von IFN- α und IFN- β wird induziert wenn virale dsRNA oder ssRNA von pathogen-erkennenden Rezeptoren wie z.B. TLR-3 (*Toll-like receptor 3*) und RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-I*) erkannt werden. Die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren löst unterschiedliche intrazelluläre Signal-transduktionskaskaden aus, welche die Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren wie IRF-3, IRF-7 oder NF- κ B verursachen, die daraufhin in den Nukleus translozieren (Asselah T. et al., 2009).

I.5.1 Interferon stimulierten Gene (ISGs)

IFN- α und IFN- β binden beide an den gleichen Zelloberflächen-Rezeptor (IFNAR) und verursachen eine intrazelluläre Signaltransduktion (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008), über den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg (JAK, *Janus-Kinase*; STAT, *Signal transducer and activator of transcription*). Durch Bindung von IFN- α / β an den heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus IFNAR1 und IFNAR2, erfährt dieser eine Konformationsänderung, wodurch die rezeptorassoziierten Janus-Kinasen JAK1 und TYK2 phosphoryliert werden. Anschließend erfolgt die Rekrutierung der inaktiven STAT-Proteine und deren Phosphorylierung durch die Janus-Kinasen. Die phosphorylierten STAT1- und STAT2-Proteine bilden daraufhin ein Heterodimer, das den Faktor IRF-9 (*interferon regulatory factor 9*) bindet. Der so entstandene Komplex bildet den Transkriptionsfaktor ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*), der in den Nukleus transloziert (Katze M.G. et al., 2002). Dort findet eine spezifische Bindung an die ISRE-Sequenz (ISRE, *interferon stimulated response element*) im Promotorbereich von Zielgenen, den *ISGs* (*interferon stimulated genes*) statt, wodurch die Transkription von *ISGs* initiiert wird.

Zu den am besten charakterisierten *ISGs* gehören die Proteinkinase R (PKR, EIF2AK2, *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*), die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS-Proteine) Ribonuklease L (RNase L), und die GTPase, MxA (Samuel C.E., 2001). Die meisten durch IFN-Aktivierung translatierten Proteine sind direkt an der Hemmung der HCV-Vermehrung beteiligt (Schoggins J.W., Rice C.M., 2011). Die Kinase, PKR entfaltet ihre antivirale Wirkung durch Phosphorylierung des Translationsfaktors, eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*), wodurch die HCV-Translation gehemmt und die virale Proteinsynthese verhindert wird (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008). Im Gegensatz dazu synthetisiert das OAS2-Protein 2',5'-Oligoadenylate, welche die RNase L aktivieren (Clemens M.J., Vaquero C.M., 1978). Durch die Bindung kommt es zur Dimerisierung der RNase L. Diese spaltet anschließend die virale ssRNA und hemmt die Virus-Replikation (Floyd-Smith G. et al., 1981). Das MxA-Protein (*myxovirus resistance A*) inaktiviert Viruspartikel, indem es diese Partikel oder andere virale Komponenten bindet (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008).

I.6 ISG15 und der ISGylierungsprozess

Eines der *ISGs*, dessen Genexpression am stärksten durch Interferone aktiviert wird, ist das *ISG15* (*interferon stimuliertes gene 15*). *ISG15*-Genexpression wird sowohl durch Typ-I-Interferone wie

IFN- α und IFN- β (Zhao C. et al., 2004; Zhao C. et al., 2005) als auch mit einer schwächeren Intensität durch Typ-III-Interferone induziert (Kotenko, Langer, 2004; Zhang D., Zhang D-E., 2011). Das humane *ISG15*-Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und kodiert für ein Ubiquitin-ähnliches Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa (Farell P.J. et al., 1979; Knight et al., 1988; NCBI). Charakteristisch für ISG15 sind zwei Ubiquitin-homologe Proteindomänen, die sich jeweils N- und C-Terminus in der ISG15-Proteinsequenz befinden (Chen L. et al., 2011). Wie Ubiquitin wird ISG15 über ein C-terminales Glycin-Glycin-Motiv reversibel durch eine Isopeptidbindung an Zielproteine gebunden. Dieser Prozess wird als ISGYlierung (Abb. 1) bezeichnet und wird ebenfalls von den Enzymen E1, E2 und E3 katalysiert. Die Expression dieser Enzyme wird wie beim ISG15 durch Typ-I-Interferone induziert (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008).

Bei der ISGYlierung wird das humane ISG15 vergleichbar mit Ubiquitin als Vorläufer-Protein translatiert. Das ISG15-Vorläuferprotein wird zum reifen Protein prozessiert, indem eine noch unbekannte Protease die Sequenz am C-Terminus spezifisch spaltet und das Di-Glycin-Motiv freigelegt wird (Harty R.N., Pitha P.M., Okumura A., 2009). Anschließend wird das prozessierte ISG15-Protein (Abb. 1) spezifisch an das E1-Enzym, UbE1L (*ubiquitin-activating enzyme E1-like*) gebunden und aktiviert (Kim K.I. et al., 2006). Das an E1 gebundene ISG15 wird danach auf das E2-Enzym (UbCH8, UBE2L6 *ubiquitin-conjugating enzyme E2L6* oder UbCH6) übertragen (Zhao C. et al., 2004). Anschließend wird durch eine der drei E3-Ligasen (HERC5, *Hect domain and RLD5*; HHARI, *human homologue of ariadne* oder EFP, *estrogen-responsive finger protein*) das ISG15 kovalent mit dem Zielprotein verbunden (Zhao C. et al., 2004; Zou W. und Zhang DE., 2006). Nach derzeitigem Kenntnisstand führt die ISGYlierung von Zielproteinen im Gegensatz zu Poly-Ubiquitinylierung nicht zu einem Proteinabbau über das Proteasom (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008; Zhang D., Zhang D-E., 2011), sondern ähnelt eher der Mono-Ubiquitinylierung. Die ISG15-spezifische Protease USP18 (*Ubiquitin specific peptidase 18*, früher UBP43) spaltet das ISG15 wieder von den Zielproteinen ab (DeISGYlierung) und macht den ISGYlierungs-Prozess reversibel.

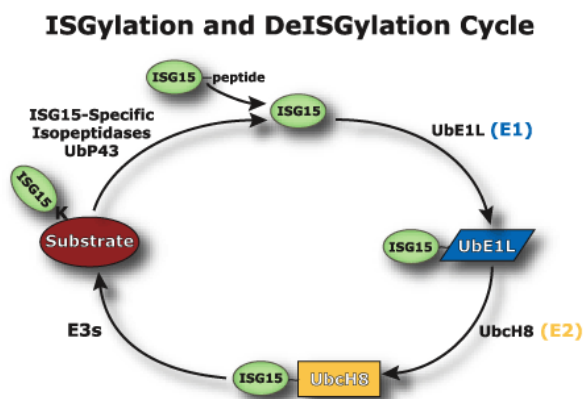


Abb.1: Mechanismus der ISGYlierung (Beschreibung des ISG15-Proteins, Boston Biochem®, An R&D Systems Company)

I.6.1 biologische Funktionen von ISG15

ISG15 existiert in drei verschiedenen Formen, der freien intrazellulären ISG15-Form, an seine Zielproteine gebundenes ISG15 (ISGylierung) und als extrazelluläres vorkommendes ISG15, das als Zytokin fungiert. Diese drei Formen besitzen unterschiedliche biologische Aktivitäten.

An Zielproteine gebundenes ISG15 moduliert nach derzeitigen Erkenntnissen die Funktion seiner Zielproteine, deren Stabilität, ihre zelluläre Lokalisation oder Verlust ihrer Funktion. Die ersten Anhaltspunkte dafür lieferten die massenspektrometrischen Untersuchungen von Zhao et al. Sie identifizierten ca. 300 potentielle Zielproteine, die intrazellulär an das ISG15-Protein gebunden werden (Zhao C. et al., 2005; Durfee L.A. et al., 2010). Unter diesen Proteinen befinden sich interferoninduzierte Zellproteine wie z.B. MxA, RIG-1, PKR (Zhao C. et al., 2005; Durfee L.A. et al., 2010). Aber auch Proteine, die an der Regulation der Signaltransduktion von Typ-I-Interferonen (IFN- α und IFN- β) beteiligt sind wie z. B. JAK1, ERK1 (*extracellular signal-regulated kinase 1*) und STAT1 (Malakhov M.P. et al., 2003). Einige der ISG15-Zielproteine sind konstitutiv exprimierte Zellproteine, die bei zellulären Prozessen wie der Stressantwort, Translation und Organisation der Zellstruktur bedeutsam sind (Zhao C. et al., 2005; Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass ISG15/ISGylierung die Replikation eines breiten Spektrums von DNA- und RNA-Viren hemmt. Lenschow et al. demonstrierten, dass ISG15-Konjugation die Replikation von Influenza A-, Sindbis- oder Herpes-Simplex-Virus (HSV-1) verschlechtert (Lenschow D.J. et al., 2007). Mit *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass *ISG15-knock-out* Mäuse (*ISG15*^{-/-}) eine mangelnde Immunreaktion auf die viralen Infektionen zeigten. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen waren die *ISG15-knock-out* Mäuse anfälliger für Infektionen und wiesen eine höhere Letalität gegenüber den Wildtyp-Mäusen auf, aufgrund fehlender ISGylierung (Lenschow D.J. et al., 2007). Beim Influenza A-Virus wurde ein direktes Zielprotein von ISG15, das virale NS1A (*nonstructural protein-1 A*) identifiziert. Die ISG15-Bindung des NS1A-Proteins führt zu dessen Funktionsverlust (Zhao C. et al., 2010). Bei den anderen Viren allerdings sind die ISG15-Zielproteine und der zugrunde liegende Mechanismus derzeit noch unbekannt. Zusätzlich zu seiner intrazellulären Rolle wird ISG15 von Monozyten und Lymphozyten sezerniert und ist im Blut und Urin nachweisbar (D’Cunha J. et al., 1996). Extrazelluläres ISG15 moduliert als Zytokin die immunologische Abwehrreaktion, indem es die Produktion und Sekretion von Typ-II-Interferonen (IFN- γ) aus B-Zellen und die IFN- γ -Produktion in T-Zellen stimuliert. IFN- γ aktiviert anschließend Monozyten und Makrophagen. Zusätzlich verstärkt extrazelluläres ISG15-Protein die Proliferation von natürlichen Killerzellen (NK) und

induziert u.a. die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Recht M. et al., 1991; D’Cunha J. et al., 1996).

I.6.2 Differentielle Genexpression von *ISG15* und weiteren *ISGs* in der Leber von HCV-Patienten

Asselah et al. und Chen et al. haben die basale Expression von zahlreichen Genen in Leberbiopsaten von HCV-Patienten analysiert, um anhand von Genexpressionsprofilen eine Prognose über den Therapie-Erfolg aufstellen zu können (Chen L. et al., 2005; Asselah T. et al., 2008). Ihre Daten zeigten, dass Non-Responder und Responder unterschiedliche Genexpressionsprofile besitzen. Bei Non-Respondern zeigt sich eine stark erhöhte mRNA-Expression von bestimmten *ISGs* vor der antiviralen Therapie (pegIFN- α und Ribavirin). Beide Studien identifizierten übereinstimmend *ISG15* und vier weitere *ISGs* (*IFI-6-16*, *IFI27*, *OAS2*, *IFIT1*), die bei Non-Respondern in der Leber signifikant höher exprimiert waren. Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass das Nicht-Ansprechen von HCV-Patienten auf die antivirale Behandlung mit der hepatischen Hochregulation insbesondere von *ISG15* assoziiert ist (Chen L. et al., 2005; Asselah T. et al., 2009). Asselah und Mitarbeiter postulierten, dass Non-Responder möglicherweise nicht auf das exogene Interferon ansprechen, weil bei diesen HCV-Patienten im Vergleich zu den Respondern das Interferonsystem insbesondere die *ISGs* vor Therapiebeginn bereits maximal induziert sind (Asselah T. et al., 2008).

I.6.3 *ISG15*, ein stimulierender Faktor für den HCV-Lebenszyklus

Bei HCV wurde ein stimulierender Effekt von *ISG15* auf die virale Replikation gezeigt. Broering et al. zeigten, dass die *ISG15*-mRNA nach Suppression mit spezifischen siRNAs in den murinen und humanen HCV-Replikonzellen (MH1- und Con1-Zellen) zu einem signifikanten Rückgang der HCV-Replikation führte, der mit einer IFN-vermittelten Hemmung vergleichbar war (Broering R. et al., 2010). Des Weiteren zeigte Chen et al., dass Überexpression von *ISG15* und daraus resultierende Erhöhung der ISGylierung in dem infektiösen HCV-Zellkultursystem (HCV FL-J6/JFH) zur erhöhten HCV-Produktion führte (Chen L. et al., 2010b). Chen et al. demonstrierten auch, dass ISGylierung der hauptsächliche Mechanismus ist durch den *ISG15* die HCV- Vermehrung beeinflusst und nicht das freie *ISG15*-Protein oder *ISG15* als Zytokin.

I.6.4 Zelltypspezifische Expression des *ISG15*-Proteins in der Leber von HCV-Patienten

Des Weiteren zeigten Chen L. et al., dass die *ISG15*-Expression bei Non-Respondern und Respondern in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist. Im Lebergewebe aus Leberbiopsien vor

Therapiebeginn wird das ISG15-Protein bei Non-Respondern hauptsächlich in den Hepatozyten exprimiert (Chen L. et al., 2010a). Im Gegensatz dazu war bei den Respondern das ISG15-Protein hauptsächlich in den Makrophagen der Leber induziert und nicht in den Hepatozyten (Chen L. et al., 2010a). Vermutlich zeigt die ISG15-Produktion in den Makrophagen, dass diese Immunzellen sich in einem stärker aktivierten Zustand befinden und eine effektive Immunantwort gewährleisten, sodass diese Patienten auf die antivirale Therapie ansprechen (Chen L. et al., 2011). Ausgehend von diesen Ergebnissen wird vermutet, dass Responder und Non-Responder sich grundlegend in ihrer Immunantwort auf die HCV-Infektion unterscheiden.

I.7 Regulationsmechanismen der Genexpression

Die Genexpression wird durch verschiedene Faktoren wie Einzelnukleotid-Polymorphismen, DNA-Methylierung und regulatorischen miRNAs reguliert, die im Folgenden detailliert erklärt werden. Diese könnten möglicherweise für die unterschiedliche *ISG15*-Genexpression bei HCV-Patienten verantwortlich sein und somit für den Erfolg oder Misserfolg der antiviralen HCV-Therapie bei diesen Patienten bedeutsam.

I.7.1 Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)

Bei einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) handelt es sich um einen Basenaustausch an einer definierten Position der DNA-Sequenz. Diese Basenvariationen sind zufällig im humanen Genom verteilt und werden von Generation zu Generation vererbt. Der Definition entsprechend zählen nur Einzelbasenvariationen zu SNPs, die mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population auftreten (Barnes M.R. 2002). Im humanen Genom werden etwa drei bis sechs Millionen SNPs vermutet und machen mit rund 90% die Mehrheit aller genetischen Variationen bei Menschen aus (Neumann R. 2000).

Es gibt drei Formen der genetischen Variabilität in der Basenabfolge: den Basenaustausch, die Insertion und die Deletion einer oder mehrerer Basen. Befindet sich der SNP in den kodierenden Gen-Regionen, den Exonen, dann kann die Aminosäure-Sequenz unverändert bleiben oder der Polymorphismus ist biologisch relevant, weil ein Aminosäureaustausch stattfindet. Einzelnukleotid-Polymorphismen, die nicht zum Austausch einer Aminosäure führen und die Proteinfunktion nicht beeinflussen, sind synonyme SNPs im Gegensatz zu den nicht-synonymen SNPs, die ein Protein und somit seine biologische Funktion verändern. Eine weitere Gruppe von SNPs trägt einen Basenaustausch im regulatorischen Abschnitt eines Gens, dem Promotor. Diese können wichtige Kontrollelemente des Gens wie die Bindestellen von Transkriptionsfaktoren oder

andere regulatorische Elemente des Promotors verändern und somit die Expression des nachfolgenden Gens beeinflussen (Schork N.J. et al., 2000).

I.7.2 Methylierung von CpG-Dinukleotiden

Die Expression eines Gens kann auch durch eine DNA-Methylierung reguliert werden (Mund C. et al., 2006; Bird A. 2002). Häufig wird dabei das Cytosin in den CpG-Dinukleotiden (CpG, Cytosin phosphatidyl Guanin) zu 5'-Methylcytosin umgewandelt. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert. Die CpG-Dinukleotide sind im gesamten humanen Genom ungleichmäßig verteilt und liegen normalerweise methyliert vor (Deaton A.M.; Bird A., 2011). Eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden ist nur in den sogenannten CpG-Inseln zu finden, die vorwiegend in den regulatorischen Promotorregionen der humanen Gene vorkommen und in der Regel unmethyliert sind (Gardiner-Garden M.; Frommer M., 1987; Mund C. et al., 2006;). Die Promotoren der meisten konstitutiv exprimierten Gene wie der *housekeeping* Gene oder einiger gewebespezifischer Gene weisen solche CpG-Inseln auf (Deaton A.M.; Bird A., 2011).

Der Methylierungsgrad in den CpG-Inseln ist häufig ein Maß für die Transkriptionsaktivität der zugehörigen Gene, denn eine geringe Methylierung im Promotor ermöglicht eine ungehinderte Transkription des zugehörigen Gens, eine verstärkte Methylierung verursacht eine Reduzierung der Gentranskription. Die Promotor-Methylierung führt deshalb zur reduzierten Expression des nachfolgenden Gens, weil der Promotorbereich vermutlich nicht mehr für die Transkriptionsfaktoren zugänglich ist (Beier V. et al., 2004; Deaton A.M.; Bird A., 2011). Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters sind in der Literatur häufig im Zusammenhang mit der Zellalterung und der Tumorgenese von verschiedenen Krebsarten beschrieben, zum Beispiel wenn diverse Tumor-Suppressorgene durch die DNA-Methylierung inaktiviert werden und eine unkontrollierte Proliferation einsetzt (Deaton A.M.; Bird A., 2011).

I.7.3 miRNA und ihre Biogenese

Genomische Studien zeigten, dass Teile des humanen Genoms nicht nur Protein-kodierende Gene sondern auch Gene für regulatorische mikroRNAs (*microRNA*, miRNA) enthalten (Kiss T. 2002). Mit einer Länge von 19 bis 24 Nukleotiden sind miRNAs kleine, nicht kodierende, doppelsträngige RNAs. Sie regulieren ebenfalls die Genexpression allerdings auf post-transkriptioneller Ebene (Kiss T. et al., 2002; Chen X-M., 2009). Im humanen Genom sind kodierende Gensequenzen für etwa 1500 miRNAs identifiziert (Griffiths-Jones S. 2004; Griffiths-Jones S. et al., 2008; Hoffmann T.W. et al., 2012).

Die Transkription der miRNAs (Abb. 2) erfolgt durch die RNA-Polymerase (Lee Y. et al., 2004; Etheridge A. et al., 2011). Das primäre miRNA-Transkript (pri-miRNA, *primary miRNA*) ist einige hundert Nukleotide lang und wird im Nukleus durch den Enzymkomplex mit der RNase III (Drosha) zum miRNA-Vorläufer, der pre-miRNA (*precursor miRNA*) prozessiert (Lee Y. et al., 2003; Etheridge A. et al., 2011). Die pre-miRNA ist 70-100 Nukleotide lang und wird durch Exportin-5 aus dem Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Yi R. et al., 2003). Dort wird sie durch eine weitere RNase III (Dicer) zur reifen doppelsträngigen miRNA gespalten (Hoffmann T.W. et al., 2012). Ein Strang der reifen miRNA, der Leitstrang, wird im RISC-Komplex (RISC, *RNA-induced silencing complex*) gebunden. Dieser miRNA-RISC-Komplex interagiert mit der 3' untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA (Etheridge A. et al., 2011). Nach derzeitigen Erkenntnissen wird vermutet, dass eine partielle Komplementarität der Basenpaarungen zwischen einer speziellen Region der miRNA und seiner Ziel-mRNA die Translation der mRNA hemmt und eine vollständige Paarung zur Degradierung der Ziel-mRNA führt, ähnlich dem RNA-Interferenz-Mechanismus (RNAi) von *small interfering RNAs* (siRNA) (Etheridge A. et al., 2011). Eine miRNA kann an der Regulierung von unterschiedlichen Ziel-mRNAs beteiligt sein (Hoffmann T.W. et al., 2012), ebenso kann die Degradierung einer mRNA durch viele verschiedene miRNAs eingeleitet werden (Bartel D.P., 2004; Xu Q. et al., 2012).

Mit einer Kern-Sequenz (*seed*-Sequenz), die sich in der 5'-Region von reifen miRNAs befindet, bindet die miRNA die Ziel-mRNA (Hoffmann T.W. et al., 2012). Diejenigen miRNAs, die die gleiche *seed*-Sequenz besitzen, werden in eine miRNA-Familie eingeordnet, obwohl sie nicht dieselben Ziel-mRNAs regulieren (Jalvy-Delvaille S. et al., 2012).

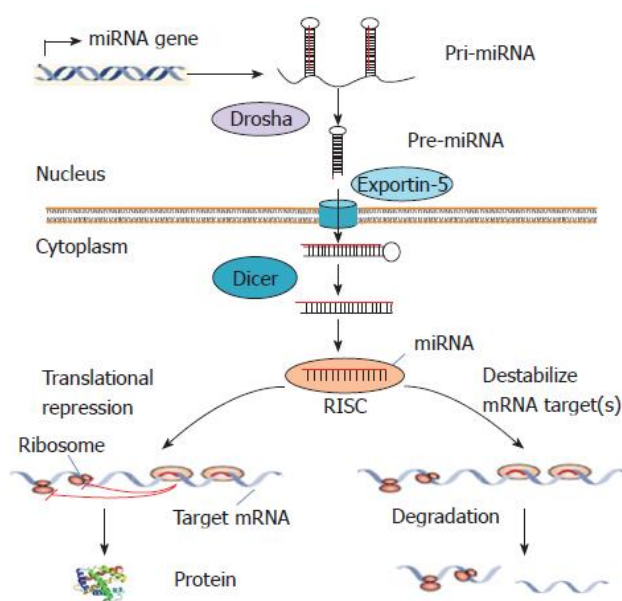


Abb. 2: Biogenese von miRNAs (Quelle: Chen X-M., *World J. Gastroenterology* 2009 April)

I.7.3.1 miRNA-122 stimuliert die HCV-Translation

Die miRNA-122 repräsentiert etwa 70% der in der Leber vorkommenden miRNAs und wird in großen Mengen in den Hepatozyten exprimiert (Lagos-Quintana M. et al., 2002; Hoffmann T.W. et al., 2012) und ist an der Regulation von wichtigen Stoffwechselprozessen wie zum Beispiel dem Cholesteroll- und Lipid-Metabolismus beteiligt (Esau C. et al., 2006; Jopling C.L., 2012). Im Gegensatz zu den meisten miRNAs, die eine negative regulatorische Wirkung auf ihre Ziel-mRNAs haben, führt die miRNA-122-Expression im Fall von HCV zur vermehrten HCV-Produktion (Jopling C.L. et al., 2005; Jopling C.L. et al., 2008). Das HCV-Genom weist drei miRNA-122-komplementäre Sequenzen auf. Zwei dieser Zielsequenzen befinden sich in der HCV-RNA-5'-UTR und die dritte ist in der HCV-RNA-3'-UTR lokalisiert (Henke J.I. et al., 2008). Jopling et al. demonstrierten durch Einführen von Punktmutationen in die miRNA-122-komplementären Sequenzen der HCV-RNA-5'-UTRs verschiedener HCV-RNA-Reporter-Konstrukte (Jopling C.L. et al., 2005; Yi M. et al., 2004), dass miRNA-122 an beide Zielsequenzen der HCV-RNA-5'-UTR bindet und dadurch die HCV-Vermehrung stimuliert (Jopling C.L. et al., 2008; Yi M. et al., 2006). Interessanterweise sind die beiden Bindestellen im HCV-5'-UTR bei allen HCV-Genotypen hoch konserviert (Jopling C.L., 2012). Ergänzend zu diesen Ergebnissen haben die Experimente von Henke et al. gezeigt, dass miRNA-122 durch Interaktion mit den beiden Zielsequenzen in der HCV-5'-UTR die Protein-Translation der HCV-RNA stimuliert, indem miRNA-122 die Bildung des Translations-Initiationskomplexes mit der HCV-RNA beschleunigt (Henke J.I. et al., 2008). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

I.8 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der kostenintensiven Therapie der chronischen HCV-Infektion und den Nebenwirkungen ist eine Erfolgsprognose zu Therapie-Beginn durch Bestimmung von prädiktiven Faktoren bedeutend. Dadurch sollen vor Therapie-Beginn diejenigen HCV-Patienten identifiziert werden, die schlecht auf die nachfolgende antivirale Behandlung ansprechen würden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit genetischen Untersuchungen der humanen *ISG15*-Promotorregion und verfolgte das Ziel, mögliche ursächliche Faktoren im *ISG15*-Promotor zu identifizieren, die mit dem Nicht-Ansprechen auf eine Therapie von HCV-Patienten zusammenhängen. Einerseits sollte mit Hilfe von verschiedenen Methoden wie dem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), der konventionellen Sequenzierung und der Pyrosequenzierung die Analyse von zwölf ausgewählten SNPs im *ISG15*-Promotor bei einer kleinen Kohorte von gesunden Probanden und HCV-Patienten bestimmt werden. Anschließend sollte die Untersuchung von SNPs, die in der kleinen Kohorte einen Polymorphismus im *ISG15*-

Promotor aufwies, auf eine größere Kohorte erweitert werden. Andererseits sollte in dieser Arbeit der Methylierungsgrad von CpG-Dinukleotiden im *ISG15*-Promotor mit Hilfe der Pyrosequenzierung bei einer kleinen Kohorte von gesunden Probanden und HCV-Patienten untersucht werden, um herauszufinden, ob mögliche Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen Respondern und Therapieversagern existieren. Des Weiteren lag in dieser Arbeit der Fokus darauf, die neue Technik der Pyrosequenzierung im Laboratorium zu etablieren.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden wirtseigenen Faktoren, *ISG15* und der leberspezifischen miRNA-122 bei der HCV-Vermehrung besteht. Da für beide Faktoren bereits ein induzierender Effekt auf die HCV-Vermehrung gezeigt wurde. Mit Hilfe der Transfektion von ssRNA und der RNA-Interferenz-Technik sollte *in vitro* in den humanen Replikonzellen (Con1) der Effekt einer Suppression von miRNA-122 auf die *ISG15*-Genexpression und umgekehrt untersucht werden.

II Material und Methoden:

II.1. Chemikalien

II.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Firma

<i>Qiazol lysis reagent</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Chloroform</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>2-Propanol</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>DEPC treated water</i>	Ambion (Austin, USA)
<i>1M Tris-buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethane)</i>	Ambion (Austin, USA)
<i>PBS (phosphate buffered saline, - Ca²⁺; - Mg²⁺)</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media) glucose [4,5g/l]</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, high Großbritannien)
<i>DMEM/Ham's F12-Medium</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Opti-MEM® I reduced serum-Medium</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Trypsin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>L-Glutamine (100x)</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Genetecin (G418-sulfate)</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Penicillin</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Streptomycin</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Fetal bovine serum</i>	PAA Laboratories (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>Lipofectamin™2000 Transfection Reagent</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Lipofectamin™ RNAiMAX Transfection Reagent</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>HiPerfect Transfection Reagent</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Ethidium bromide (0,025 %)</i>	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>TBE running buffer (10x), (Tris-Borat-EDTA)</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>TopVision™ agarose</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>Ethanol (96-100%)</i>	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>PyroMark gold Q24 reagents (5x24)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PyroMark binding buffer (200 ml)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PyroMark denaturation solution (500 ml)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PyroMark wash buffer, concentrate (200 ml)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PyroMark annealing buffer (250 ml)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Streptavidin sepharose high performance</i>	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
<i>RNAse free water</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Nuclease free water</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>dNTP-Mix (10 mM each)</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>MgCL₂ (50 mM)</i>	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules,USA)

II.1.2 Verwendete Kits /Sets

Kits / Sets

Bestellnummer

Firma

<i>miRNeasy Mini Kit</i>	217004	Qiagen (Hilden, Deutschland)
--------------------------	--------	------------------------------

Material und Methoden

<i>RNeasy Mini Kit</i>	74106	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>MiniElute PCR Clean-up Kit</i>	28004	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>QIAamp DNA Mini Kit for genomic DNA</i>	51306	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit</i>		
<i>Kit</i>	204154	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>RNase-free DNase Set</i>	79254	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>HotStarTaqPlus DNA-Polymerase (1000 Units)</i>	203605	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PyroMark PCR Kit</i>	978703	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>EpiTect Bisulfite Kit</i>	59104	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>EpiTect PCR control DNA-Set</i>	59695	Qiagen (Hilden, Deutschland)

II.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
Zellkulturflaschen, steril (250 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
24-Lochplatten, steril mit Deckel	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Küvetten (Einmal-Küvetten, Plastik)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten (0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen (0,1-1000 µl)	Starlab (Ahrensburg, Deutschland)
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>Twin.tec® real-time PCR-plates 96</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>Twin.tec® PCR-plates 96 (teilbar)</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>PyroMark® Q24 plates (100)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
24-Lochplatte für PCR, ohne Rahmen (40)	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
<i>PyroMark® Q24 vacuum prep troughs (12)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>PCR 12er-CapStrips</i>	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
<i>PCR 12er-Strips</i>	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
<i>PyroMark® Q24 Cartridge (3)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Heat sealing film (10x10)</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Adhäsive Verschlussfolien	Nerbe plus GmbH (Winsen, Deutschland)
MINI Gelgießstand	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MINI Kämme	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

II.3 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller	Modell
Autoklav	Systec GmbH	Systec VX-150
Photometer (<i>BioSpectrometer</i>)	Eppendorf	<i>Basic</i>
MINI Elektrophorese-Kammer	Roth	
<i>Power Supply</i>	Bio-Rad	<i>(PowerPac™ Basic)</i>
Mikroskop	Zeiss	Primo Vert
<i>Mastercycler® ep realplex</i>	Eppendorf	
<i>Heat sealer</i>	Eppendorf	
Wasserbad	Oehmen	GFL

Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5424
Zentrifuge	Eppendorf	MiniSpin plus
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415R
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5810R
PCR-Cycler (mit Gradienten)	Eppendorf	Vapo.protect
PyroMark® Q24	Qiagen	
PyroMark® Q24 vacuum workstation	Qiagen	
Brutschrank (Inkubator)	Heraeus	HERAcell
Sterilwerkbank	Heraeus	LB-72-C LaminAir
Magnetschüttler (<i>Thermo electron MonoShake</i>)	Thermo Electron LED GmbH	
Heizblock, <i>Dri-Block Heater</i>	Techne	FDB02AD
Heizblock (für Pyrosequenzierung)	Techne	Dri-Block® DB-2D
<i>Dry vacuum pump/compressor</i>	Welch	

II.4 Verwendete Internetseiten, Software und Programme

Microsoft Office, Version 2010	Text- und Bildbearbeitung, Tabellenkalkulation, Statistik (Microsoft; Redmond, USA)
Primer 3	Internetprogramm zur Oligonukleotidsuche (Oxford Universität, Großbritannien)
NEB Cutter	Internetprogramm zur Analyse von Restriktionsschnittstellen (New England BioLabs; Massachusetts, USA)
NCBI	Internetseite zur Sequenzsuche von Genen, SNP- Analyse, Literaturrecherche
PyroMark Assay Design 2.0	Software zum Erstellen von Sequenzierungs- und DNA-Methylierung-Tests, Entwerfen von PCR und Sequenzier-Oligonukleotiden (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Q24 Software	Software zum Auswerten von Sequenzierungs und DNA-Methylierungs-Untersuchungen (Qiagen; Hilden, Deutschland)
Chromas Lite 2.01	Programm zur Auswertung von DNA-Sequenzierungen (Technelysium Pty Ltd; Australien)
GraphPad PRISM 4.0	Statistiksoftware (GraphPad Software Inc.; San Diego, USA)

II.5 Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im humanen *ISG15*-Promotorbereich

II.5.1 Suche nach SNPs in der *ISG15*-Promotorregion

Die SNPs wurden mit Hilfe der NCBI-Datenbank (*National Center of Biotechnology Information*) ausgesucht. Für die Fragestellung dieser Arbeit wurden zwölf SNPs im Promotorbereich des humanen *ISG15*-Gens auf dem Chromosom 1 im Bereich chr1: 947955-948870 ausgewählt. In der Tabelle 1 sind diese zwölf SNPs mit den entsprechenden Informationen über ihre Position auf dem Chromosom1, ihre Kennungsnummer bei NCBI, Sequenz um den SNP und der verwendeten FASTA Sequenz-Nummer dargestellt. Auf das eventuelle Vorhandensein von Angaben zu Populationsverteilungen der genutzten SNPs wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tab. 1: Liste mit den zwölf ausgewählten SNPs des *ISG15*-Promotors (human)

Position im <i>ISG15</i> -Promotor(bp)	SNP-Nummer	Kurzsequenz um den SNP (vorwärts)	SNP	FASTA Sequenz-Nummer (30.08.2012)
948870	rs4615788	GCCTGC[C/G]GAAGCCGG	C/G	ss275682061
948847	rs5772027	GGCTTA[-/A]TAATAGGGC	-/A	ss229263751
948846	rs3841266	AGGCTT[-/T]ATAATAGGG	-/T	ss287939520
948692	rs2341365	GTCCCC[A/G]CCACTTTTG	A/G	ss275682060
948627	rs112029659	AATGCG[C/T]GATATTTAG	C/T	ss197887370
948579	rs74045080	CATTAG[C/T]CCATGTGAT	C/T	ss482436136
948477	rs116046129	TGTTGT[C/T]ATCTCTGGG	C/T	ss218191398
948432	rs60637872	CAACAA[-/CAA]AAAAACA	-/CAA	ss287939518
948431	rs72502744	ACAACA[-/CAA]AAAAAAC	-/CAA	ss104663011
948423	rs59308546	CAAAAA[-/ACAA]CAACAA	-/ACAA	ss81748099
948422	rs35478934	ACAAAA[-/AAC]ACAACAA	-/AAC	ss50178321
948421	rs113047134	CACAAA[-/AAC]AAACAACA	-/AAC	ss255892769

II.5.2 Patienteninformation

II.5.2.1 SNP-Analyse im *ISG15*-Promotor bei einer kleinen Probanden- und Patientenanzahl

Die Untersuchung der SNPs wurde zuerst bei einer kleinen Probanden- und HCV-Patientenanzahl durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA von elf Probanden (Norm-Kollektiv) und insgesamt 20 HCV-Patienten (HCV-Kollektiv), davon zehn Responder (SVR) und zehn Therapieversager (acht Relapser, zwei Non-Responder) (Tab. 2) verwendet. Das entsprechende Probenmaterial stammte aus einer im Zeitraum von 12/2007 bis 02/2009 an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum Essen durchgeführten PEGIFN/Ribavirin-Studie. Die Proben von Probanden und HCV-Patienten wurden pseudonymisiert. Erstere wurden mit A-L und die der HCV-Patienten mit Nummern 1-20 bezeichnet. Die HCV-Patienten 1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 16 und 20 sind Therapieversager (Non-Responder: Pat. 2 und 6; Relapser: Pat. 1, 8, 9, 11, 12, 13, 16 und 20) und die HCV-Patienten 3, 4, 5, 7, 10, 14, 15, 17, 18 und 19 sind Responder.

Tab. 2: Liste mit dem Norm- und HCV-Kollektiv bei kleinen Probanden- und Patientenzahl

	Anzahl (n)	Geschlecht (m/w)	Alter
Norm-Kollektiv (n=11):	11	3/8	48,0 ± 17,5
gesund	5	0/5	35,3 ± 17,9
PBC	1	0/1	63,0 ± 0
PSC	5	3/2	55,2 ± 12,8

HCV-Kollektiv (n=20):	20	13/7	48,1 ± 12,2
SVR (Responder)	10	7/3	42,7 ± 11,2
Therapieversager	10	6/4	53,6 ± 11,2

Norm-Kollektiv als Kontroll-Gruppe besteht aus Proben von gesunden Probanden, PBC-Patienten (PBC, primär biliäre Zirrhose) und PSC-Patienten (PSC, primär sklerosierende Cholangitis). HCV-Kollektiv besteht aus Proben von Respondern und Therapieversagern wie Non-Respondern und Relapsern.

II. 5.2.2 SNP-Analyse im *ISG15*-Promotor bei einer größeren Probanden- und Patientenzahl

Des Weiteren wurde der SNP rs60637872 bei einer größeren Probanden- und HCV-Patientenzahl untersucht. Das Probenmaterial wurde im Rahmen verschiedener Studien unabhängig von dieser Arbeit im Zeitraum von 2003-2011 im Universitätsklinikum Essen gesammelt und die genomische DNA bei -20°C gelagert. Es wurde die bereits vorliegende genomische DNA von 31 Probanden und insgesamt 127 HCV-Patienten verwendet (Tab. 3). Die Proben von den HCV-Patienten wurden mit 21-189 nummeriert.

Tab. 3: Liste mit dem Norm- und HCV-Kollektiv zur Genotypisierung von SNP rs60637872 bei größeren Probanden- und Patientenzahl

	Anzahl (n)	Geschlecht (m/w)	Alter
Norm-Kollektiv (n=31):	31	10/21	36,6 ± 10,8
gesund	27	10/17	34,2 ± 8,3
PBC	3	0/3	44,0 ± 3,5
PSC	1	0/1	74,0 ± 0
HCV-Kollektiv (n=127):	127	80/47	43,1 ± 9,9
SVR	55	34/21	41,8 ± 10,6
NR	29	19/10	46,1 ± 8,2
Relapser	21	14/7	44,4 ± 11,2
BT (<i>break through</i>)	8	6/2	42,8 ± 3,1
therapienaiv	14	7/7	40,8 ± 10,1

Norm-Kollektiv besteht aus Proben von gesunden Probanden, PBC-Patienten (PBC, primär biliäre Zirrhose) und PSC-Patienten (PSC, primär sklerosierende Cholangitis). HCV-Kollektiv besteht aus Proben von Respondern, Therapieversagern wie Non-Respondern, Relapsern, HCV-Patienten mit virologischen Durchbruch (BT, *break through*) und therapienaiven HCV-Patienten.

II.5.3 Isolierung der genomischen DNA aus peripheren Blutmonozyten (PBMC)

Zur Isolierung der genomischen DNA aus dem Vollblut von gesunden Probanden wurde das *QIAamp DNA Mini Kit* (siehe II.1.2 verwendete Kits) verwendet. Die Proben wurden zur Aufarbeitung entweder bei -20°C gelagert oder direkt zur Isolierung der DNA verwendet. Die Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Anfangs wurden 300 µl Blut mit 30 µl Proteinase K-Lösung versetzt und gut gemischt. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl AL-Puffer dazu gegeben und gründlich gemischt und der gesamte Ansatz für 10 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl 96-100%-igem Ethanol und ein erneutes gründliches Mischen. Das Lysat wurde auf die *QIAamp Mini spin* Säule gegeben und bei 12.000 rpm, 1 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde in zwei Zentrifugationsschritten aufeinanderfolgend mit 500 µl AW1-Puffer (8.000 rpm, 1 min, RT) und 500 µl AW2-Puffer (14.000 rpm, 3 min, RT) gewaschen. Danach folgte bei 14.000 rpm über 1 min die Trockenzentrifugation der Säule. Die DNA wurde mit 200 µl AE-Puffer eluiert (8.000 rpm, 1 min, RT) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

II.5.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der isolierten DNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Einmalküvette bestimmt. Dazu wurden 2 µl DNA mit 60 µl H₂O verdünnt. Die gemessene Reinheit der DNA, dargestellt durch den Quotienten der Extinktionen 260nm/280nm lag zwischen 1,6-1,9. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der untersuchten Probanden- und Patienten-Proben für die PCR mit H₂O (*nuclease free water*) auf ~ 50 ng/µl eingestellt.

II.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Abschnitten mit den zu untersuchenden SNPs verwendet. Dazu wurde die DNA-Probe als Matrize, ein Vorwärts- und ein dazugehöriges Rückwärts-Oligonukleotid, freie Nukleotide (dNTP-Mix), Magnesiumchlorid (MgCl₂), die hitzestabile *HotStarTaq-Plus-DNA-Polymerase* und der dazugehörige Puffer eingesetzt. Für die PCR wurde das Kit *HotStarTaq-Plus-DNA-Polymerase* (1000) verwendet, der die entsprechende DNA-Polymerase, den passenden PCR-Puffer (10x) und die *Q-Solution* (5x) enthält. Für jedes Oligonukleotid-Paar wurden im Vorversuch die Reaktionsbedingungen optimiert. Zur Durchführung der PCR wurde ein allgemeiner PCR-Ansatz

Material und Methoden

(*Master-Mix*) ohne die DNA-Proben in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt und davon 19 µl auf PCR-Streifen (*PCR-strips*) vorgelegt. Im Anschluss wurde zu jedem PCR-Ansatz 1 µl der entsprechenden DNA-Probe zugegeben. Beispielhaft ist in der Tabelle 4 ein *Master-Mix* mit und ohne *Q-Solution* gezeigt.

Tab. 4: PCR *Master-Mix* +/- *Q-Solution*

	Volumen (µl)
PCR-Puffer (10x)	2,0
MgCl ₂ [50 nM]	1,6
(optional: <i>Q-Solution</i> (5x))	(4,0)
dNTPs [10 µM]	0,4
Vorwärts-Oligonukleotid [10 µM]	0,4
Rückwärts-Oligonukleotid [10 µM]	0,4
gDNA [~50 ng]	1,0
<i>HotStarTaq Plus</i> -Polymerase	0,1
H ₂ O (<i>nuclease free water</i>)	14,1 (10,1 falls mit <i>Q-Solution</i>)
Gesamtvolumen	20,0

Des Weiteren sind in der Tabelle 5 die verwendeten Oligonukleotide, die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide und die entsprechenden Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

Tab. 5: Aufgelistet sind für die PCR verwendete humanen Oligonukleotide für die SNP-Analyse mit interner Bezeichnung der Oligonukleotide (Invitrogen).

SNP-Nummer	Oligonukleotid Vorwärts& Rückwärts (5' →3')	Oligonukleotid- Annealing	Zugabe von <i>Q-Solution</i>
rs4615788	ISG15PromBF: AAACCGAAACTGAAGCCAAA ISG15PromBR: CAAGTCCTGTACTGGCAA	60°C	+ <i>Q-Solution</i>
rs5772027	ISG15PromBF: AAACCGAAACTGAAGCCAAA ISG15PromBR: CAAGTCCTGTACTGGCAA	60°C	+ <i>Q-Solution</i>
rs3841266	ISG15PromBF: AAACCGAAACTGAAGCCAAA ISG15PromBR: CAAGTCCTGTACTGGCAA	60°C	+ <i>Q-Solution</i>
rs2341365	ISG15PromDF: GCATCCTGTGAAGGATCTGG ISG15PromDR: TTTGGCTTCAGTTTCGGTTT	60°C	- <i>Q-Solution</i>
rs112029659	ISG15PromEF: GCATCCTGTGAAGGATCTGG ISG15PromER: TTTGGCTTCAGTTTCGGTTT	60°C	+ <i>Q-Solution</i>

rs74045080	ISG15PromFF: TGGTAAATGGAAAATGAAACCA ISG15PromFR: CCAGAGTGAGCGGAAGAAAC	60°C	+ Q-Solution
rs116046129	ISG15PromCF: TTGCAATGAGATGAGATCGTG ISG15PromCR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	60°C	- Q-Solution
rs60637872	ISG15PromGF: CTACGTGGGAGGCTGAGGT ISG15PromGR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	58°C	+ Q-Solution
rs72502744	ISG15PromGF: CTACGTGGGAGGCTGAGGT ISG15PromGR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	58°C	+ Q-Solution
rs59308546	ISG15PromGF: CTACGTGGGAGGCTGAGGT ISG15PromGR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	58°C	+ Q-Solution
rs35478934	ISG15PromGF: CTACGTGGGAGGCTGAGGT ISG15PromGR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	58°C	+ Q-Solution
rs113047134	ISG15PromGF: CTACGTGGGAGGCTGAGGT ISG15PromGR: TCCCCATGGTTAATTGAGAAA	58°C	+ Q-Solution

Mit den Ansätzen wurde folgende PCR durchgeführt: Im ersten Zyklus-Schritt wurde die doppelsträngige Template-DNA bei 95°C denaturiert, sodass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen lösen und die beiden Stränge getrennt werden (Denaturierung). Im Anlagerungsschritt (Annealing), binden die Oligonukleotide an ihre spezifisch komplementären Sequenzen. Die Anlagerungstemperatur wurde im Vorversuch mit Hilfe eines Temperatur-gradienten für jedes Oligonukleotid-Paar optimiert. Sie betrug abhängig vom Oligonukleotid-Paar 50-60°C. Im letzten Zyklus-Schritt fügt die *HotStarTaq Plus*-Polymerase bei 72°C freie Nukleotide (dNTPs) an die Oligonukleotide an und verlängert beide komplementären Stränge zu einer doppelsträngigen DNA (Elongation). Die synthetisierten Doppelstränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize für die Synthese neuer DNA-Stränge. Nach Beenden des letzten Zyklus wurde abschließend ein einmaliger finaler Elongationsschritt von zehn Minuten bei 72°C durchgeführt und die Proben bis zur Entnahme anschließend gekühlt.

II 5.6 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Darstellung der PCR-Produkte nach der PCR, zur Kontrolle der Restriktion bei der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen-Methode (RFLP) und zur Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten für die Sequenzierung verwendet.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde die Größe des spezifischen PCR-Produkts überprüft, indem 3 µl vom ungereinigten PCR-Produkt mit 1 µl Ladelösung (*Loading Dye*) versetzt und in einem 2%-igen Agarosegel (w/v) zusammen mit einem DNA-Größenmarker (3 µl) aufgetrennt wurde. Das Agarosegel wurde mit 1X TBE-Puffer (*TBE running buffer*) angesetzt und die Elektrophorese bei 10 V/cm durchgeführt. Zur Kontrolle der Restriktion (RFLP) wurde 6 µl des Restriktionsansatzes in einem 3% Agarosegel aufgetrennt, um DNA-Fragmente, die kleiner als 100 bp sind, nachzuweisen. Für beiden Elektrophoresen wurde der *GeneRuler™ low Range* DNA-Größenmarker (Tab. 6) verwendet. Als Vorbereitung für die Sequenzierung wurden 3 µl der gereinigten PCR-Produkte zusammen mit 3 µl *FastRuler™ low Range* DNA-Marker (Tab. 6) zur Konzentrationsbestimmung in einem 2% Agrosegel aufgetrennt und anschließend die Konzentration des PCR-Produkts geschätzt.

Um die DNA-Fragmente anschließend in dem Agarosegel zu visualisieren, wurden die Gele mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. Dafür wurden vor der Gelelektrophorese 50 ml geschmolzener Agarose mit 75 µl einer 0,025% EtBr-Lösung versetzt. Der Farbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA, wodurch die DNA-Fragmente nach Beenden der Gelelektrophorese unter UV-Licht als Banden erkennbar waren.

Tab. 6: Verwendete DNA-Größenmarker und Ladelösung

DNA-Größenmarker (<i>DNA Ladder</i>)/ Ladelösung	Bestellnummer	Firma
<i>GeneRuler™ low Range DNA Ladder</i>	SM1191/2/3	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>FastRuler™ low Range DNA Ladder</i>	SM1103	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>6x Orange Loading Dye</i>	R0631	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

II.5.7 Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen mit der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode (RFLP)

Bei SNPs, die sich im Bereich einer Restriktionsschnittstelle von einer Restriktionsendonuklease befinden, wurde zur Untersuchung des Polymorphismus die RFLP-Methode verwendet. Dazu wurden die PCR-Produkte mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert, die spezifisch definierte Sequenzen erkennen und nur bei einer der SNP-Variante die DNA schneiden. Das Auftreten des SNPs in der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease wurde zuvor mit dem NEBCutter Internetprogramm überprüft. In dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in der Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Verwendete Restriktionsenzyme mit deren Erkennungssequenzen und bei der Restriktion eingesetzten BSA und Puffer der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA)

Restriktionsenzyme / Puffer / BSA	Erkennungs- sequenz	Bestell- nummer	Firma
<i>Bst</i> UI [10U/μl]	CGCG	R0518S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Cvi</i> KI-1 [5U/μl]	RGCY	R0710S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Fau</i> I [5U/μl]	CCCGC	R0651S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Hha</i> I [20U/μl]	GCGC	R0139S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Hin</i> PI [10U/μl]	GCGC	R0124S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Mse</i> I [50U/μl]	TTAA	R0525M	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Mwo</i> I [5U/μl]	GCN ₇ GC	R0573S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
<i>Psi</i> I [5U/μl]	TTATAA	R0657S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
purified BSA (100x)	-	B9001S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
NE-Buffer 3 (10x)	-	B7003S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
NE-Buffer 4 (10x)	-	B7004S	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)

Zur Restriktion wurde ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von 15 μl verwendet, bestehend aus dem spezifischen Restriktionsenzym (abhängig von seiner Konzentration wie in Tab. 7 angegeben), 1 μl geeignetem Puffer (10x) (siehe Tab. 8), 6 μl ungereinigtes PCR-Produkt und ggf. 0,15 μl BSA (100x). Da das eingesetzte PCR-Produkt noch Puffer aus der PCR enthielt, wurde für die Restriktion eine geringere Menge an Restriktionsenzym-spezifischen Puffer als empfohlen verwendet um eine angepasste Salzkonzentration für den DNA-Verdau zu erhalten. Die Verwendung von BSA wurde, falls vom Hersteller empfohlen, dazugegeben. Der gesamte Ansatz wurde abschließend mit H₂O (*nuclease free water*) aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz entsprechend der Herstellerangaben bei einer für das Enzym optimalen Temperatur und Zeit inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Restriktionsenzyme außer *Bst*UI und *Mwo*I für 20 Minuten bei 65°C oder 80°C gemäß den Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert (Tab. 8). Übersichtshalber sind in der Tabelle 8 die Restriktionen mit deren Bedingungen zusammengefasst. Zum Nachweis des Restriktionsergebnisses wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Tab. 8: Restriktionsbedingungen:

Restriktions-enzym	Einsatz des Restriktions-enzym in 15 µl Endvolumen	Puffer (NEBuffer)	Temperatur & Zeit	BSA	Hitze-inaktivierung
<i>Bst</i> UI [10U/µl]	0,8 µl	NEBuffer 4	60°C, 15 min	-	-
<i>Cvi</i> KI-1 [5U/µl]	1,0 µl	NEBuffer 4	37°C, 15 min	-	80°C, 20 min
<i>Fau</i> I [5U/µl]	1,0 µl	NEBuffer 4	55°C, 60 min	-	65°C, 20 min
<i>Hha</i> I [20U/µl]	0,5 µl	NEBuffer 4	37°C, 15 min	BSA	80°C, 20 min
<i>Hin</i> PI [10U/µl]	0,8 µl	NEBuffer 4	37°C, 15 min	-	80°C, 20 min
<i>Mse</i> I [50U/µl]	0,2 µl	NEBuffer 4	37°C, 15 min	BSA	65°C, 20 min
<i>Mwo</i> I [5U/µl]	1,0 µl	NEBuffer 3	60°C, 60 min	-	-
<i>Psi</i> I [5U/µl]	1,0 µl	NEBuffer 4	37°C, 60 min	-	65°C, 20 min

II.5.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem *MinElute PCR Clean-up* Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz (50 µl) mit 5-facher Menge an PB-Puffer versetzt, auf die *Clean-up* Säule gegeben und 1 min bei 13.000 rpm und bei RT zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer und ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und RT für 1 min. Abschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert und die an die Säule gebundene DNA mit 30 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert (13.000 rpm, 1 min, RT). Die eluierte DNA wurde bis zur Sequenzierung über Nacht bei 4°C gelagert.

II.5.9 konventionelle DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte zur SNP-Genotypisierung wurde von dem DNA-Sequenzierservice im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurden die DNA-Proben mit H₂O (*nuclease free water*) auf ~ 50 ng/µl verdünnt und sowohl die Proben als auch die entsprechenden Oligonukleotide [5 pmol/µl] zur Sequenzierung abgegeben.

II.6 Genetische Untersuchungen von SNPs und CpG-Dinukleotiden im humanen *ISG15*-Promotor mittels Pyrosequenzierung

In dieser Arbeit wurde die Pyrosequenzierung einerseits zur Analyse von zwei SNPs (rs60637872) verwendet und andererseits zur Untersuchung des Methylierungsgrades von CpG-Dinukleotiden im

humanen *ISG15*-Promotor angewandt. Im Gegensatz zu der konventionellen Sequenzierung hat die Pyrosequenzieretechnik den Vorteil, dass diese Methode exakte und schnelle Ergebnisse für die Sequenzierung von kurzen DNA-Bereichen liefert. Die für die Pyrosequenzierung verwendeten Kits, Geräte, Puffer, Reagenzien und Software wurden von der Firma Qiagen (Hilden, D) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

II.6.1 Untersuchung von SNPs mit Pyrosequenzierung

Für die Analyse der zu untersuchenden SNPs wurde zunächst mit der PyroMark® Assay Design Software 2.0 ein Pyrosequenzierungs-Test und zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Region die passenden Oligonukleotide erstellt. Anschließend erfolgte die Amplifikation des DNA-Abschnitts beispielsweise mit dem SNP rs60637872 durch die beiden spezifischen Oligonukleotide, „ISG15del F1bioF“ und „ISG15del R2“, die in der Tabelle 9 dargestellt sind. Das 5'-Ende von „ISG15del F1bioF“ ist biotinyliert, um ein biotinyliertes PCR-Produkt zu erhalten. Für die PCR-Reaktion wurde anfangs ein allgemeiner Ansatz mit dem vom Hersteller empfohlenen PyroMark® PCR Kit hergestellt, der auf PCR-Streifen verteilt wurde. Die Zusammenstellung des PCR-Ansatzes ist der Tabelle 10 zu entnehmen. Die nachfolgende PCR-Reaktion wurde ähnlich wie im Abschnitt II.5.5. beschrieben zunächst mit einem Enzymaktivierungsschritt gestartet und wurde anschließend durch aufeinanderfolgende Denaturierungs-, Anlagerungs- und Elongationsschritte fortgesetzt. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen PCR war die Dauer der Zyklusschritte bei diesem PCR-Programm etwas kürzer und ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 9: Für die PyroMark®-PCR verwendeten humanen Oligonukleotid von MWG (Bebbersberg, Deutschland)

Oligonukleotid- Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Oligonukleotid- Annealing
ISG15del F1bioF	Bio-TCGTGCCTCTGCACTCCA	60°C
ISG15del R2	TCGGTTTAGGGCAGTATTTGCTC	60°C
ISG15_TATA_F1	CGTGTGTGCCTCAGGCTTATAAT	60°C
ISG15_TATA_R2bio	Bio-CCTGTACTGGCAAAGATGAGTTC	60°C

Material und Methoden

Tab. 10: PCR-Ansatz mit dem PyroMark® PCR Kit

	Volumen (µl)
<i>PyroMark Master Mix</i> (2x)	12,5
MgCl ₂ [25 nM]	2,5
<i>Q-Solution</i> (5x)	5,0
Vorwärts-Oligonukleotid [10nM]	0,5
Rückwärts- Oligonukleotid [10nM]	0,5
gDNA [~ 50 ng]	1,0
H ₂ O (<i>RNase free water</i>)	0,5
<i>CoralLoad</i> (10x)	2,5
Gesamtvolumen	25,0

Tab. 11: PyroMark® PCR-Programm

Zeit	Temperatur	Zyklen
Enzymaktivierung: 15 min.	95°C	
Denaturierung: 30 sek.	94°C	} X 45
Annealing: 45 sek.	60°C	
Elongation: 1 min.	72°C	
Finale Elongation: 10 min.	72°C	
Inkubation, unendlich	8°C	

Da bei der Pyrosequenzierung nur der biotinylierte DNA-Strang des PCR-Produkts als Template verwendet wird, wurde dieser Strang vor der Pyrosequenzierung an Streptavidin-Sepharose-Beads immobilisiert. Dazu wurden *Binding Buffer*, Streptavidin-Sepharose-Beads und H₂O wie in der Tabelle 12 gezeigt, angesetzt. Von diesem Ansatz wurden 70 µl in eine 24-PCR-Lochplatte einer teilbaren 96-Lochplatte vorgelegt und pro Vertiefung 10 µl von den zu untersuchenden PCR-Produkten zugegeben. Diese PCR-Platte wurde danach mit einer Folie beklebt und für 10 Minuten bei RT auf einem Magnetschüttler kräftig geschüttelt um eine optimale Bindung der Streptavidin-Sepharose-Beads an den biotinylierten DNA-Strang des PCR-Produkts zu ermöglichen.

Tab. 12: *Master-Mix* für die Immobilisierung des PCR-Produktes an die Beads vor der Pyrosequenzierung

	Volumen (µl)
<i>Binding Buffer</i>	40,0
Streptavidin-Sepharose-Beads	2,0
H ₂ O (<i>RNase free water</i>)	28,0
PCR-Produkt	10,0
Gesamtvolumen	80,0

Anschließend wurden die an Streptavidin-Sepharose-Beads gebundenen biotinylierten DNA-Stränge mit Hilfe des Vakuum-Tools, der an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, aus dem Ansatz isoliert. Das Streptavidin-Sepharose-Beads/PCR-Produkt-Gemisch wurde dazu mit 70% Ethanol, Denaturierungslösung und Waschpuffer versetzt. Durch die Denaturierungslösung wurde das doppelsträngige PCR-Produkt in Einzelstränge aufgetrennt und nur der gebundene, biotinylierte DNA-Strang (ssDNA) erhalten. Der andere Einzelstrang wurde mit dem Waschpuffer fortgewaschen. Im Anschluss daran wurden die Beads mit gebundenem Einzelstrang in die PyroMark Q24 Platte überführt, in der bereits 25 µl eines Ansatzes bestehend aus 23,5 µl *Annealing Buffer* und 1,5 µl Sequenzier-Oligonukleotid „ISG15del Seq“ [5 µM] (siehe Tab. 13) vorgelegt waren.

Tab. 13: Für die Pyrosequenzierung verwendeter Sequenzier-Oligonukleotid von MWG (Bebbersberg, Deutschland)

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Oligonukleotid-Annealing
ISG15del Seq	AGTATTTGCTCAGATTGGT	80°C

Die PyroMark Q24 Platte wurde zum Anlagern des Sequenzier-Oligonukleotids, „ISG15del Seq“ an den biotinylierten Einzelstrang für 2 Minuten bei 80°C im Heizblock inkubiert. Nach einer anschließenden Abkühlzeit von 5 Minuten wurde die Platte in den Pyrosequenzer PyroMark® Q24 gestellt. Vor dem Start der Messung wurde die Kartusche des Geräts mit dem Enzym-Mix, der Substratlösung und den einzelnen Nukleotiden A, T, G und T aus dem PyroMark Gold Q24 *Reagents Kit* nach Herstellerangaben befüllt und danach die Messung gestartet.

Bei der nachfolgenden Pyrosequenzierungsreaktion wird der DNA-Einzelstrang mit gebundenem Sequenzier-Oligonukleotid zu einem Doppelstrang vervollständigt und während dieser Synthese der neue Strang sequenziert. Dabei baut die DNA-Polymerase komplementär zu der Template-DNA-Strang Nukleotide ein. Dafür wurde im Vorfeld ein entsprechender Pyrosequenzierungs-Test mit der PyroMark® Assay Design Software 2.0 angefertigt, damit der Pyrosequenzer automatisiert in einer zum Template-DNA-Strang vorgegebenen Reihenfolge schrittweise das passende Nukleotid zum Ansatz injiziert.

Wie in der Abbildung 3 zu sehen, entsteht beim erfolgten Einbau eines Nukleotids ein

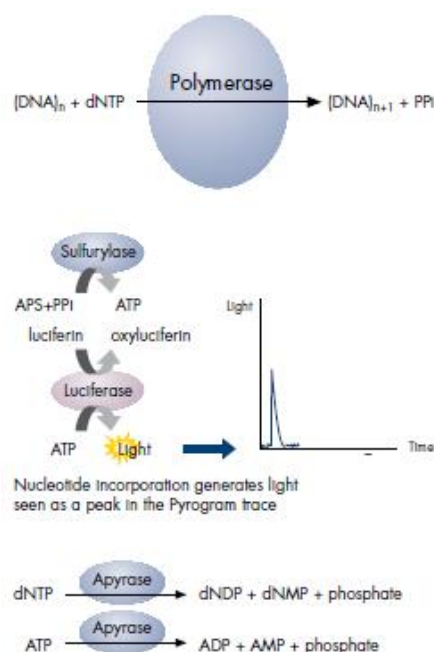


Abb. 3: Enzymkaskade bei der Pyrosequenzierung (Qiagen Handbuch)

Pyrophosphat (PPi), das eine Enzymkaskade in Gang setzt. Dieses Pyrophosphat wird mit APS (Adenosin-5'-phosphosulfat) durch die ATP-Sulfurylase anschließend zu ATP (Adenosin-5'-triphosphat) umgesetzt. Das ATP wird im nächsten Schritt mit dem Substrat Luziferin durch die Luziferase zu Oxyluziferin umgewandelt, das ein detektierbares Lichtsignal erzeugt, welches proportional zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide ist. Folgen zwei oder mehr gleiche Nukleotide in der Sequenz aufeinander, ist das Signal doppelt oder um ein entsprechend Mehrfaches höher als das Signal von einem Nukleotid. Die Reaktion wird durch die Apyrase wieder beendet, weil sie die Umsetzung von ATP katalysiert. Nach Beenden der Pyrosequenzierung werden die detektierten Lichtsignale (engl. *Peak*) mit der PyroMark® Q24 Software ausgewertet.

II.6.2 Untersuchung von CpG-Dinukleotiden mit Pyrosequenzierung

Die Untersuchung des Methylierungsgrades in den CpG-Dinukleotiden erfolgte ebenfalls mit der Pyrosequenzierung. Zuerst wurde eine Bisulfit-Konvertierung durchgeführt. Das Prinzip der Bisulfit-Konvertierung beruht darauf, dass eine Sulfongruppe in unmethylierte Cytosine eingeführt (Sulfonierung) und danach durch H₂O die Aminogruppe abgespalten wird (hydrolytische Deaminierung), sodass ein Uracil-Sulfonat entsteht. Danach erfolgt die Desulfonierungs-Reaktion, bei der die (anfänglich an unmethylierte Cytosin-Reste) angefügte Sulfon-Gruppe wieder entfernt wird und dadurch aus dem Uracil-Sulfonat ein Uracil entsteht. Die Desulfonierung stellt den finalen Schritt in der Bisulfit-Konvertierung von Cytosinen dar und erfolgt als Teilschritt der DNA-Reinigung. Durch Abfolge dieser Reaktionsschritte werden unmethylierte Cytosine in den CpG-Dinukleotiden chemisch zu Uracilen umgewandelt, methylierte Cytosine bleiben dagegen unmodifiziert. Es folgt eine PCR bei der Uracile als Thymin amplifiziert werden während methylierte Cytosine unverändert als Cytosine in der DNA-Sequenz bleiben. Um Unterschiede zwischen unmethylierten und methylierten CpG-Dinukleotiden darzustellen, wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit der Pyrosequenzierung analysiert. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

Genomische DNA von gesunden Probanden und HCV-Patienten wurde zuerst mit dem Bisulfit-Reagenz aus dem EpiTect® Bisulfit Kit nach Herstellerangaben behandelt. Standardmäßig wurde für die Bisulfit-Konvertierung ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 140 µl hergestellt mit je 1 µl genomischer DNA (~ 50 ng), 19 µl H₂O (*RNase free*), 85 µl von in H₂O (*RNase free*) angesetztem Bisulfit-Mix und 35 µl DNA-Schutzpuffer (*DNA Protect Buffer*, 4x). Der Einsatz des *DNA Protect* Puffers dient zur Vermeidung einer DNA-Fragmentierung während der Bisulfit-Reaktion. Zusätzlich besitzt dieser Puffer einen Indikator. Nach Zugabe zum Bisulfit-Ansatz tritt eine Farbänderung von grün zu blau ein und zeigt so den richtigen pH-Wert für eine

optimale Konvertierungsreaktion an. Die Proben wurden 5 h entsprechend der Herstellerangaben inkubiert. Das verwendete Programm ist in der Tabelle 14 dargestellt und beinhaltet eine Abfolge von DNA-Denaturierungsschritten bei 95°C und Inkubationsschritten bei 60°C. Bei dem Denaturierungsschritt wurde die doppelsträngige DNA in die Einzelstränge (ssDNA) aufgetrennt, um bei dem anschließenden Inkubationsschritt eine Sulfongruppe in unmethylierte Cytosine einzuführen (Sulfonierung) und durch hydrolytische Deaminierung Uracil-Sulfonat zu erzeugen.

Tab. 14: Programm für die Bisulfit-Konvertierung

Zeit	Temperatur
Denaturierung: 5 min	95°C
Inkubation: 25 min	60°C
Denaturierung: 5 min	95°C
Inkubation: 85 min	60°C
Denaturierung: 5 min	95°C
Inkubation: 175 min	60°C

Nach der Bisulfit-Behandlung wurden die Proben über EpiTect Spin Säulen gereinigt. Dafür wurden die Proben mit der ssDNA jeweils in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 560 µl frisch vorbereiteten BL-Puffer, der 10 µg/ml *Carrier*-RNA beinhaltet, an die Membran der EpiTect Spin Säule gebunden. Die Verwendung der *Carrier*-RNA wird bei kleinen Mengen von genomischer DNA verwendet, da die *Carrier*-RNA zusätzlich die Bindung der ssDNA an die Säulenmembran erhöht. Danach wurde die gebundene DNA mit 500 µl BW-Puffer durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT für 1 min gewaschen, um das restliche Bisulfit-Salz aus der Probe zu entfernen. Abschließend erfolgte die Desulfonierungs-Reaktion, zur Entfernung der Sulfon-Gruppen aus den Uracil-Sulfonaten, was zur Bildung von Uracilen führt. Dazu wurden die Proben mit jeweils 500 µl BD-Puffer für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl BW-Puffer und ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und RT für 1 min um das Desulfonierungs-Reagenz von der Säule zu entfernen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Säulen wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zum Trocknen mit geöffnetem Deckel für 5 min, bei 56°C im Heizblock inkubiert. Die gereinigte Bisulfit-konvertierte DNA wurde zuletzt mit 40 µl EB-Puffer von der Säule eluiert (12.000 rpm, RT und 1 min). Die gereinigte, Bisulfit-konvertierte DNA diente als Template bei der nachfolgenden PCR-Reaktion und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Amplifikation der zu untersuchenden *ISG15*-Promotorsequenz wurde, wie bei der SNP-Analyse, das PyroMark® PCR Kit verwendet. Da mit der Pyrosequenzierung nur kurze DNA-Abschnitte exakt analysiert werden können, wurde der *ISG15*-Promotor mit den zu untersuchenden

CpG-Dinukleotiden im Vorfeld in drei Abschnitte unterteilt. Für jeden Abschnitt wurde mit der PyroMark® Assay Design Software 2.0 ein passender Pyrosequenzierungs-Test (CpG-5'-Test, CpG-3'U-Test und CpG-3'D-Test) erstellt. Dabei wurden pro Test jeweils zwei Oligonukleotide (Tabelle 15) eingesetzt, die im Vorfeld anhand einer theoretisch konvertierten DNA-Sequenz mit der gleichen Software erstellt wurden. Es wurde derselbe PCR-Ansatz wie in der Tabelle 10 (siehe Abschnitt II.6.1) verwendet. Das PCR-Programm zur CpG-Untersuchung wurde wie in der Tabelle 11 gezeigt verwendet, allerdings mit jeweils 30 sek. in der Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Annealingtemperatur wurde für jedes Oligonukleotid-Paar in Vorversuchen mittels eines Temperaturgradienten ermittelt und war wie in der Tabelle 15 aufgeführt entweder 56° oder 58°C.

Tab. 15: Für die PCR verwendeten humane Oligonukleotide von MWG (Bebersberg, D)

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Oligonukleotid-Annealing
i15_CpG-3'D_F1b	TGAAGTGTGTGTTTTAGGTTTATAATAGGG	56°C
i15_CpG-3'D_R3	ACCACCACACAAACTCCTATACTAACA	56°C
i15_CpG-3'U_F2	GGGAAAGGGAAATAGAAATTGAAGTTAAAT	56°C
i15_CpG-3'U_R2b	ACCACCACACAAACTCCTATACTAACA	56°C
i15_CpG 5'as_F2	GATATTTAGGTGTTTTTAGGGTGTG	58°C
i15_C5' R1bio	ACCTACCCTAATAACCAATTTAACTCAA	58°C

Für die Pyrosequenzierung wurden biotinylierte ssDNA-Stränge, wie im Abschnitt II.6.1 beschrieben, mit Hilfe der PyroMark Vakuumstation isoliert und aufgearbeitet. Die Template-ssDNA wurde anschließend in eine 24-Lochplatte überführt, in welcher das passende Sequenzier-Oligonukleotid vorgelegt war und danach die Platte bei 80°C für 2 min auf dem Magnetschüttler inkubiert. Die verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide sind der Tabelle 16 mit der jeweiligen internen Bezeichnung zu entnehmen.

Tab. 16: Verwendete humane Sequenzier-Oligonukleotide zur Untersuchung der DNA-Methylierung von MWG (Bebersberg, D)

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Oligonukleotid-Annealing
i15_CpG-3'D_S1	ACTCCTATACTAACAATAATAAT	80°C
i15_CpG-3'U_S2	AATTGAAGTTAAATTTGGTTAT	80°C
i15_CpG 5'as_S2	GTTGGGTGGGGGTGG	80°C

Abschließend wurde die Analyse der CpG-Dinukleotide in dem Pyrosequenzer, PyroMark® Q24 durchgeführt, während die entsprechende Auswertung mit der PyroMark® Q24 Software im CpG-Analyse Modus erfolgte.

II.7 Zellkultur

II.7.1 Kultivierung der humanen Con1-Zelllinie

Die Con1-Zelllinie basiert auf der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7 und besitzt ein subgenomisches, bicistronisches HCV-Replikon, welches für die Nicht-Strukturproteine (NS3, NS4a, NS4b, NS5a und NS5b) des HCV-Genotypen 1b kodiert (I₃₇₇/NS3-3', Genbank *Accession No.* AJ242652) (Lohmann V. et al, 1999). Das beschriebene HCV-Replikon kann sich selbst replizieren, aber aufgrund des Fehlens von Strukturproteinen keine Viruspartikel bilden und ist deshalb nicht human infektiös. Die Con1-Zellen wurden im *Dulbecco's modified Eagle's-Medium (DMEM, High Glucose [4,5 g/l])*, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fötales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert) und mit Geneticin (G418-Sulfat, 500 µg/ml) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 90-100% wurden diese unter der Sterilwerkbank bei RT passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer (*Phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen in DMEM-Kulturmedium in einer 1:5 Verdünnung aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche (250 ml) überführt. Die passagierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Passagierung erfolgte ca. 2x pro Woche.

II.7.2 Suppression der Genexpression (RNA-Interferenz)

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus, der die Genexpression von Zielgenen mittels kurzer interferierender RNAs wie siRNA oder endogen vorkommenden miRNA durch Bindung an ihre/deren Ziel-mRNA hemmt. In dieser Arbeit wurden interferierende RNAs mit Hilfe eines Transfektions-Reagenz ins Zellinnere eingebracht (Transfektion), die unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe die Spaltung oder die Inhibition der Translation von Ziel-mRNAs bewirken. Bei der Transfektion wurden verschiedene Transfektions-Reagenzien verwendet, die eine ähnliche Wirkungsweise aufweisen. Sie enthalten kationische und neutrale Lipide, welche in wässriger Lösung vesikuläre Strukturen (Liposomen) ausbilden. Durch elektrostatische Wechselwirkung der negativ geladenen RNA mit den kationischen Lipiden der Liposomen bilden sich Komplexe aus, welche durch Anheftung an die Zelloberfläche über Endozytose ins Zellinnere aufgenommen werden.

II.7.2.1 Ansetzen der RNA-Stammlösungen

Die bei der Transfektion verwendeten kommerziell erhältlichen siRNAs und andere interferierende RNAs wie *negative control inhibitor*, *miRNA-122-inhibitor* und *miRNA-122-mimic* wurden nach

Herstellerangaben eingesetzt, indem die lyophilisierten RNAs (standardmäßig) mit RNase freiem H₂O resuspendiert und jeweils eine Stammlösung von 20 µM hergestellt wurde. Die Stammlösungen wurden in einer entsprechenden Endkonzentration eingesetzt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

II.7.2.2 Transfektion von Con1-Zellen mit *Lipofectamin*TM2000/*Lipofectamin*TMRNAiMAX

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden am Tag zuvor pro Vertiefung einer 24-Lochplatte in 500 µl DMEM-Medium ausgesäten Con1-Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Suppression der humanen miRNA-122 wurden die Con1-Zellen mit 50 nM eines spezifischen miRNA-122-Inhibitors transfiziert. Die miRNA-122-Mimik wurde mit Endkonzentration von 5 nM eingesetzt. Bei miRNA-122-Mimik handelt es sich um eine chemisch synthetisierte, doppelsträngige RNA (dsRNA), welche die reife endogene miRNA-122 in den Zellen nachahmt. Der miRNA-122-Hemmstoff ist eine ssRNA, der spezifisch die miRNA-122-Funktion hemmt. Für miRNA-122-Hemmstoff und miRNA-122-Mimik wurde jeweils ein separater Transfektionsansatz hergestellt, der sich aus je zwei Ansätzen (A und B) zusammensetzte. Ansatz A, bestehend aus 0,15 µl (50 nM oder 5 nM Endkonzentration) der entsprechenden 20 µM miRNA-Stammlösung und 50 µl des Transfektionsmediums (*Opti-MEM®I Reduced Serum Medium*) wurde in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Der Ansatz B wurde in einem zweiten Reaktionsgefäß aus 2 µl des Transfektions-Reagenz, *Lipofectamin*TM2000 und 50 µl des Transfektionsmediums hergestellt. Anschließend wurden die Ansätze A und B zusammengegeben, gut gemischt und für 20 min bei RT inkubiert, damit die miRNA und das Transfektionsreagenz ein Transfektionskomplex bilden können. Nach der Inkubation wurde 100 µl des Transfektionskomplexes tröpfchenweise pro Vertiefung zu den Con1-Zellen gegeben und die 24-Lochplatte vorsichtig geschüttelt. Die transfizierten Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen für 48 h und 72 h bei 37°C inkubiert. Nach 8 h wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ausgetauscht.

Zur Untersuchung eines synergistischen Effekts von siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff auf die HCV-Replikation wurden die Con1-Zellen mit dem Transfektions-Reagenz *Lipofectamin*TMRNAiMAX und mit 7,5 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siNC, *non-silencing siRNA*), 7,5 nM einer gegen die humane *ISG15*-mRNA-Sequenz spezifischen siRNA (siISG15) und 75 nM miRNA-Hemmstoffen (Kontroll miRNA-Inhibitor und spezifischer miRNA-122-Inhibitor) transfiziert. Die verwendeten siRNAs, miRNA-122-Mimik, Kontroll miRNA-Hemmstoff und miRNA-122-Hemmstoff sind in der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tab. 17: Bei der Transfektion mit Lipofectamin™ verwendeten siRNAs, miRNA-Mimik, miRNA-Hemmstoffe

Bezeichnung von siRNA / miRNA-Mimik / miRNA-Inhibitor	Bestellnummer	Firma
<i>Negative control siRNA (siNC)</i>	1022076	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>miScript negative control inhibitor</i>	1027271	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Hs_G1p2_1 siRNA (siISG15)</i>	SI00072387	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Syn-hsa-miR-122 miScript miRNA mimic</i>	MSY0000421	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Anti-hsa-miR-122 miScript miRNA inhibitor</i>	MIN0000421	Qiagen (Hilden, Deutschland)

II.7.3 RNA und miRNA-Aufreinigung (Isolierung)

Zur Isolierung der Gesamt-RNA und der miRNA aus derselben Probe wurde in dieser Arbeit das *miRNeasy Mini Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Con1-Zellen wurden mit 700 µl Qiazol für 5 min lysiert bevor sie in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurden. Danach wurden 140 µl Chloroform zum Lysat gegeben, 15 sek gründlich geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert bevor es bei 12.000 rpm, für 15 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Es stellte sich eine Phasentrennung ein, deren obere wässrige Fraktion (ca. 350 µl), die RNA enthielt. Diese wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 525 µl Ethanol (100%) versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe auf die *miRNeasy*-Säule gegeben und mit 350 µl RWT-Puffer gewaschen. Für den DNase-Verdau wurden pro Säule 10 µl DNaseI-Stammlösung in 70 µl RDD-Puffer verdünnt und je 80 µl direkt auf die Säulenmembran gegeben. Es folgte für 15 min eine Inkubation bei RT. Im Anschluss wurde die Säule zunächst mit 350 µl RWT-Puffer und dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (10.000 rpm, RT für 15 sek), um abschließend die Gesamt-RNA und die miRNA zusammen in ein frisches Reaktionsgefäß mit 30 µl RNase-freiem Wasser zu eluieren (10.000 rpm, RT für 1 min). Das Eluat wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

II.7.4 Nachweis von mRNA mit quantitativer *real-time* RT-PCR

Die quantitative „*real-time*“ RT-PCR (RT, Reverse Transkription) diente zum quantitativen Nachweis von mRNA. Diese beinhaltet eine Reverse Transkription, bei der aus einer RNA-Probe cDNA (*complementary DNA*) synthetisiert wurde. Im zweiten Schritt wurde mittels quantitativer PCR mit Detektion in Echtzeit (d.h. mit Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus) das cDNA-Template amplifiziert, um die Transkription eines Gens zu quantifizieren.

In dieser Arbeit wurde die „one-step“-Methode mit dem *QuantiFast-SYBR-Green RT-PCR Kit* (siehe verwendete Kits) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit ermöglichte die

Durchführung der Reversen Transkription und der nachfolgenden *real-time*-PCR im gleichen Reaktionsgefäß. Das Kit beinhaltet außerdem den fluoreszierenden Farbstoff SYBR-Green-I, welcher die Quantifizierung der mRNA-Expression anhand von Fluoreszenz-Messungen ermöglichte. Prinzip: Bei der Amplifikation des PCR-Produkts wird SYBR-Green-I in die doppelsträngige DNA eingebaut und emittiert (bei $\lambda=521\text{nm}$) nach Anregung durch die *real-time*-PCR-Maschine ein Fluoreszenzsignal. Diese Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus in jeder Probe gemessen und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. In frühen PCR-Zyklen findet die exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt, wobei mit der Akkumulation des PCR-Produkts auch die störenden Einflüsse steigen. Daher nimmt man als Maß für die Quantifizierung denjenigen Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig den Grenzwert (*threshold*) der Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Diese Zykluszahl wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Als Quantifizierungsstrategie wurde in dieser Arbeit die relative Quantifizierung verwendet (Pfaffl MW. et al, 2004), bei der die Expression des Zielgens auf die eines endogenen nicht regulierten Haushaltsgens (*housekeeping gene*) normalisiert wurde. Zur Normalisierung wurde das ACTB (beta Aktin) herangezogen.

Standardmäßig wurde für die quantitative *real-time*-RT-PCR ein PCR-Ansatz mit 15 μl Volumen hergestellt, der aus 7,5 μl des *QuantiFast-SYBR-Green RT-PCR Master-Mixes* (2x), welcher das SYBR-Green-I enthielt, 1,5 μl jedes der Oligonukleotide (vorwärts und rückwärts), 2 μl der RNA-Probe, 0,15 μl des *QuantiFast RT-Mixes* und 2,35 μl RNase freiem Wasser bestand. Die RT-PCR-Ansätze wurden je als Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert, die anschließend mit einer Folie versiegelt wurde. In Tabelle 18 wurden die verwendeten Oligonukleotide mit der Nukleotid-Sequenz bzw. der Bestellnummer und der Anlagerungstemperatur zusammengefasst.

Tab. 18: Verwendete humane Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR

Oligonukleotid- Bezeichnung	Sequenz / Bestellnummer	Oligonukleotid- Annealing	Firma
Hs β -Aktin vorwärts	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	60°C	MWG (Bebersberg, Deutschland)
Hs β -Aktin rückwärts	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	60°C	MWG (Bebersberg, Deutschland)
Hs_HCV-5' UTR vorwärts	GCGGGTTGATCCAAGAAAGG	60°C	MWG (Bebersberg, Deutschland)
Hs_HCV-5' UTR rückwärts	ATCACTCCCCTGTGAGGAACT	60°C	MWG (Bebersberg, Deutschland)
Hs_ISG15_2 SG QuantiTect	QT01761886	60°C	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Die quantitative RT-PCR-Reaktion erfolgte im Mastercycler® ep *realplex* und wurde nach dem PCR-Programm, das in Tabelle 19 dargestellt ist, durchgeführt.

Tab.19: Programm für quantitative *real-time*-RT-PCR

Zeit	Temperatur	Zyklen
Reverse Transkription: 10 min.	50°C	
HotStarTaq Plus DNA-Polymerase-Aktivierung: 5 min.	95°C	
Denaturierung: 10 sek.	95°C	} X 40
Kombinierte Annealing/Elongation: 30 sek.	60°C	
Schmelzkurven-Determinierung	65°C	

Nach Beendigung der quantitative RT-PCR wurde in Excel nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode der Expressionsunterschied (Ratio, sog. „fold change“) des Zielgens in den untersuchten Proben berechnet (Pfaffl M.W. et al, 2004). Als Erstes wurde für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Haushaltsgens, ACTB (beta Aktin) vom Ct-Wert der Zielgens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Haushaltsgen}}$). Nach dieser Normalisierung wurde im zweiten Schritt vom ΔCt -Wert der behandelten Probe der ΔCt -Wert der unbehandelten Probe (Kontrolle) abgezogen und ergab das sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnungsmodell ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Haushaltsgen und bezogen auf eine Standardprobe, errechnete sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Ratio = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) (Pfaffl M.W. et al, 2004).

II.8 Statistische Analyse

Bei *in vitro*-Experimenten (Zellkultur) setzte sich die Versuchsanzahl (n) aus mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten zusammen. Jede Kontrolle und die jeweilige Behandlung wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm\text{SEM}$ (*standard error of mean*) angegeben.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte in dieser Arbeit mit dem Zweistichproben-t-Test (*Student's t-Test*) mit dem Programm, Excel 2010 (Microsoft). Die t-Test-Funktion wurde als zweiseitiger Test (Seiten) aufgestellt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt, das einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% entspricht. Das Ergebnis des t-Tests ist der p-Wert (engl. *p=probability*). Bei einem p-Wert, der kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ war, wurde das Testergebnis als signifikant bewertet. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis zufällig zustande gekommen ist, kleiner als 5% war.

III Ergebnisse:

Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass HCV-Patienten, die Non-Responder auf eine IFN-basierte Therapie waren, in der Leber und in PBMCs eine höhere Basisgenexpression von *ISG15* aufwiesen als Responder. Es wurde postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen dieser Hochregulation und dem Therapie-Misserfolg besteht (Chen L. et al, 2005; Asselah T. et al, 2008). Die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen dafür sind noch unbekannt. Aus diesem Grund wurde im ersten und zweiten Teil der Doktorarbeit die Fragestellung untersucht, ob möglicherweise das Nicht-Ansprechen der Therapieversager auf die antivirale Therapie mit Variationen in der DNA-Sequenz wie SNPs oder dem Methylierungsgrad von CpG-Dinukleotiden im *ISG15*-Promotor korreliert. Des Weiteren zeigten andere Publikationen, dass *ISG15* (Broering R. et al, 2010; Chen L. et al, 2010b) und miRNA-122 (Jopling C.L. et al, 2005; Jopling C.L. et al, 2008; Henke J.I. et al, 2008) einen stimulierenden Effekt auf die HCV-Replikation aufweisen. Deshalb wurde im dritten Teil dieser Arbeit in humanen HCV-Replikonzellen unter Verwendung der RNA-Interferenz-Technik untersucht, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen *ISG15* und miRNA-122 bei der HCV-Replikation besteht.

III.1 Untersuchung von SNPs im humanen *ISG15*-Promotorbereich

Zur Bestimmung eventueller DNA-Varianten wurden zwölf SNPs im humanen *ISG15*-Promotor ausgewählt und mit verschiedenen Methoden, der RFLP-Methode, der konventionellen Sequenzierung und der Pyrosequenzierung untersucht. In der Abbildung 4 ist der humane *ISG15*-Promotorbereich mit den zwölf untersuchten SNPs (hellblau) gezeigt.

Die Genotypisierung der SNPs rs2341365, rs5772027, rs3841266, rs112029659 und rs74045080 erfolgte mit der RFLP-Methode. In diesen Fällen befinden sich die SNPs im Bereich der Restriktionsschnittstelle eines Restriktionsenzym. Eine SNP-Variante wird geschnitten und so als Polymorphismus detektiert und kann von der anderen SNP-Variante unterschieden werden, die ungeschnitten bleibt. Die SNPs rs4615788, rs60637872, rs116046129, rs72502744, rs59308546, rs35478934 und rs113047134 besitzen keine Restriktionsschnittstelle und wurden deshalb mit der konventionellen DNA-Sequenzierung untersucht. Die Sequenzierung des SNPs, rs60637872 mittels konventionellen Sequenzierung lieferte bei einigen Patientenproben kein eindeutiges Ergebnis und wurde deshalb zusätzlich mittels Pyrosequenzierung überprüft. Diese liefert exaktere Ergebnisse und eignet sich daher besser zur Sequenzierung von repetitiven DNA-Sequenzen, wie im Fall des SNPs rs60637872. In den folgenden Abschnitten werden exemplarisch nur die Ergebnisse der drei SNPs, rs2341365, rs4615788 und rs60637872 detailliert beschrieben. Die Ergebnisse der anderen SNPs sind zur besseren Übersicht in tabellarischer Form zusammengefasst.

ISG15-Promotorsequenz (human) aus NCBI(ISG15/NM_005101.3/NP_005092.1); Sequence View → *positive strand***Position 947940-949019 auf Chromosom 1**

TTATTTTTTATTGAGTTGTAAGAGTTCTCTATATGTCTCGGATGCTATGCCCTCATCAGATAGATA
 ATTTGCAAATATTTCTTCCCATTCTATGGATTGTCTTTTCACTTTCTCAATAGTGTCCAGAGTTC
 ATTTTTGTAGAAAATAAAAAGATAGGTCTCTTTTATTAATAAAAACAATCTGAGGCTCCGGGTGCAGTG
 GCTCACGCCTGTAATCCCAGCAGTTTCAGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACTTGAGCCCAGGAGTTC
 GAGATCAGCCTGGGCGACATGGCGAGACCCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCC
 TGGTGGTGCACCCCTGTGGTCCCAGCTACGTGGGAGGCTGAGGTGAGAGGATCGCTTTAGCCTGGC
 AGGCGGAGGTTGCAATGAGATGAGATCGTGCCTCTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGAGAC
 CCTGTCTCAAAAACACAAA [/AAC] A [/AAC] A [/ACAA] CAACA [/CAA] A [/CAA] AAA
 AACACCAATCTGAGCAAATACTGCCCTAAACCGAGTGTGT [C/T] ATCTCTGGGTAGTTTGGAGT
 TCTTGTCTCAATTAACCATGGGGATGTTTCCAAGTTTACTAATTTGCAAGTTGGTAAATGGA
 AATGAAACCATTAG [C/T] CCATGTGATGACAGCTTTAGTGCATCCTGTGAAGGATCTGGAATGC
 G [C/T] GATATTTAGGTGTTTCCAGGGTGTGGGTGGGGGTGGGGATGCCGTCCGCTGTCCGGAGT
 CCC [A/G] CCACTTTTGCTTTTCCCTGTCTTTTCGGTCATTCGGTTTTGTTTTCTTCCGCTCACTCT
 GGGGCATGCCTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCCAAATTTGGCCACCAGCGCAGGCTCGGCG
 GCACGCCCCCTGACGTGTGTGCCTCAGGCTT [/T] A [/A] TAATA GGGCCGGTGTGCCTGC [C
 /G] GAAGCCGGCGGCTGAGAGGCAGCGAACTCATCTTTGCCAGTACAGGAGCTTGTGCCGTGGCCC
 ACAGCCCACAGCCCACAGCCATGGTAAGGCAGATGTACAGGTGGGGGGAGGTGGGCTCTGTGCCA
 GCCAATTTTCGTCTCCCTCCC

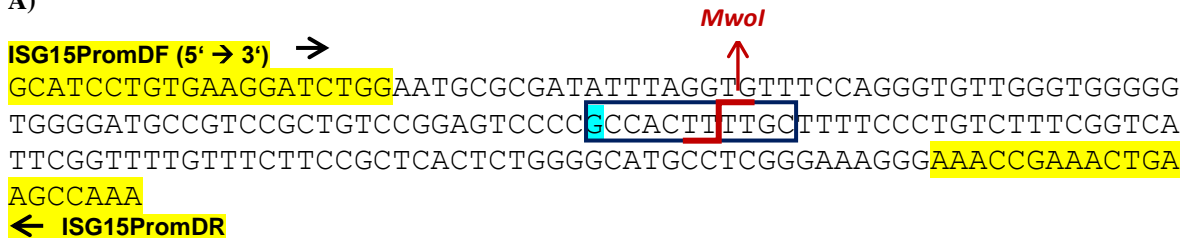
Abb. 4: Sequenz des humanen ISG15-Promotors.

Die untersuchten SNPs sind in Klammern gesetzt (hellblau), die TATA-Box (rosa) und das Start-Methionin (blau) dargestellt.

III.1.1 Genotypisierung der SNPs mit der RFLP-Methode**III.1.1.1 Genotypisierung von SNP rs2341365 [A/G] mittels RFLP**

Zur Bestimmung von SNP rs2341365 wurde der entsprechende DNA-Abschnitt im ISG15-Promotorbereich amplifiziert (Länge des PCR-Produkts 190 bp) und anschließend zur RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *MwoI* geschnitten. *MwoI* schneidet die DNA-Sequenz wenn die SNP-Sequenz ein G (Guanin) aufweist (Abb. 5A). Bei Vorhandensein eines A (Adenin) an der Position des SNPs kann *MwoI* die Sequenz nicht mehr erkennen und das PCR-Produkt bleibt ungeschnitten (Abb. 5B).

A)



Ergebnisse

B)

ISG15PromDF (5' → 3') →

GCATCCTGTGAAGGATCTGG AATGCGCGATATTTAGGTGTTTCCAGGGTGTGGGTGGGGG
 TGGGGATGCCGTCCGCTGTCCGGAGTCCCC ACCACTTTTGTCTTTTCCCTGTCTTTTCGGTCA
 TTCGGTTTTGTTTCTTCCGCTCACTCTGGGGCATGCCTCGGGAAAGGG AAACCGAAACTGA
 AGCCAAA

← ISG15PromDR

Abb. 5: Sequenz des PCR-Produkts mit dem SNP rs2341365.

A) Sequenz des PCR-Produkts mit Oligonukleotiden ISG15PromDF und ISG15PromDR (gelb), SNP-Variante G (hellblau) und markierter Erkennungssequenz (blauer Kasten) und Schnittstelle (rot) von *MwoI*.
 B) PCR-Produkt mit Oligonukleotiden ISG15PromDF und ISG15PromDR (gelb) und SNP rs2341365 mit SNP-Variante A (hellblau) dargestellt.

Von den insgesamt elf untersuchten Probanden-Proben, zehn Respondern und zehn Therapieversagern (HCV-Patienten, bei denen die HCV-RNA während der Therapie oder nach Therapieende nachweisbar war), ist in Abb. 6 beispielhaft die Restriktionsanalyse nach dem Verdau mit *MwoI* der DNA eines gesunden Probanden, drei Respondern und drei Therapieversager gezeigt.

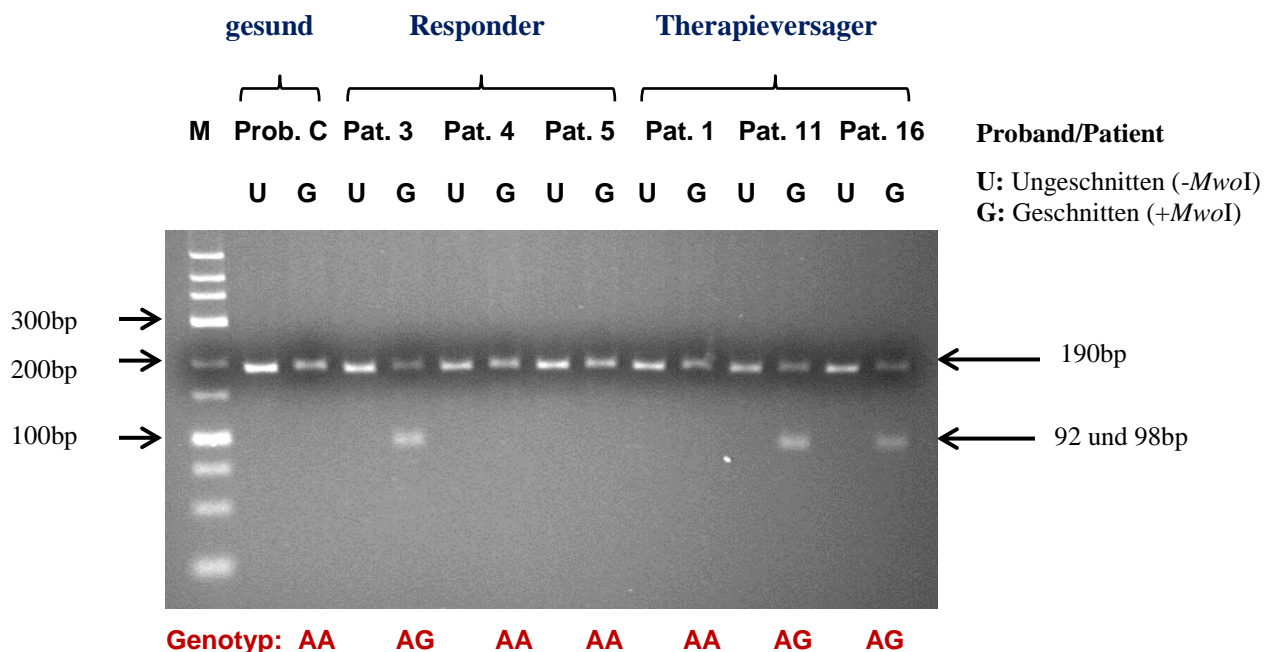


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten nach der Restriktionsanalyse mit *MwoI*. M: Low Range Gene Ruler™ DNA-Marker (25-700bp); Auftragung abwechselnd des ungeschnittenen PCR-Produkts (-*MwoI*) und des mit *MwoI* geschnittenen PCR-Produkts (+*MwoI*) im Agarosegel (3%). Gesunder Proband (Proband C), drei Responder (Patient 3, 4 und 5) und drei Therapieversager (Patient 1, 11 und 16).

Das ungeschnittene PCR-Produkt weist eine Größe von 190bp auf. Beim homozygoten Genotypen AA ist ebenfalls nur ein Fragment von 190bp zu sehen, da beide Allele die SNP-Variante haben, die von *MwoI* nicht geschnitten werden. Im Fall eines heterozygoten Genotyps AG sind bei der mit *MwoI* inkubierten Probe zusätzlich zu der Bande des Allels A mit 190bp, zwei Fragmente mit der Größe von 98bp und 92bp vorhanden, die aufgrund ihrer ähnlichen Größe im Gel auf der gleichen Höhe laufen. Das Allel mit dem SNP A, welches nicht geschnitten wird und das zweite Allel mit der SNP-Variante G, das bei der Restriktion mit *MwoI* in zwei Fragmente geschnitten wird, können somit nachgewiesen werden. Im Fall des homozygoten Genotypen GG werden beide Allele von *MwoI* geschnitten, wobei nur Fragmente auf der Höhe der 100bp-Bande des DNA-Markers vorhanden sind. Beim gesunden Probanden (Proband C) ist auf dem Agarosegelbild sowohl beim ungeschnittenen PCR-Produkt (U) als auch beim mit *MwoI* inkubierten PCR-Produkt (G) jeweils das ungeschnittene Fragment von 190bp zu sehen. Diese DNA-Probe besitzt daher die homozygote SNP-Variante AA. Die Proben der HCV-Patienten 3 (Responder), 11 und 16 (Therapieversager) weisen jeweils ein PCR-Fragment von ~190bp und zwei Fragmente nach Behandlung mit *MwoI*. Dieses Ergebnis entspricht dem heterozygoten Genotypen AG. Die HCV-Patienten 1 (Therapieversager), 4 und 5 (Responder) zeigen ebenso wie der gesunde Proband C den homozygoten Genotyp (AA). Auf die Ergebnisse der Restriktionsanalyse der 31 untersuchten Individuen wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

III.1.1.2 Zusammenfassung der Genotypisierung aller SNPs mit der RFLP-Methode

Die Ergebnisse der Genotypisierung aller SNPs, die mit der RFLP-Methode bei der kleinen Probanden- und Patientenzahl (n=31, siehe II.5.2.1 Tab. 2) untersucht wurden, sind in der Tabelle 20 zusammengefasst. Demnach hatten im Fall des SNPs rs2341365 alle elf Probanden-DNAs den homozygoten Genotyp AA. Im Gegensatz dazu zeigten einige HCV-Patienten einen Polymorphismus. Bei den Respondern besaßen von zehn untersuchten Patienten-Proben neun den homozygoten Genotypen AA und eine Patienten-Probe (Patient 3) den heterozygoten Genotyp AG. In der Kohorte der Therapieversager wurde von zehn Patienten-Proben bei zwei Proben (Patient 11 und 16) die heterozygote Variante AG und bei acht Proben der Genotyp AA gefunden. Im SNP rs2341365 wurde ein Polymorphismus zwischen dem Norm- und dem HCV-Kollektiv (Responder und Therapieversager) nachgewiesen. Interessanterweise hatte keiner der untersuchten Individuen den homozygoten Genotyp GG. Bei diesem SNP wurde von drei möglichen Genotypen nur zwei Genotypen identifiziert, was vermutlich auf eine geringe Variabilität des SNPs bei den untersuchten 31 Individuen hinweist.

Die Genotypisierung des SNPs rs5772027 bei den 31 Probanden- und Patientenproben erfolgte mit dem Restriktionsenzym *MseI*. Aus dieser Restriktionsanalyse geht hervor, dass alle 31 DNA-Proben: elf Probanden, zehn Responder und zehn Therapieversager den homozygoten Genotypen AA hatten. Der SNP rs3841266 wurde mit *PsiI* untersucht und bei allen 31 Probanden- und Patientenproben wurde nur der homozygote Genotyp TT nachgewiesen. Der SNP rs112029659 befand sich in der Restriktionsschnittstelle von den Restriktionsenzymen *HhaI*, *HinpI* und *BstUI*. In diesem Fall wurden die DNA-Proben der 31 Individuen parallel in drei Ansätzen mit allen drei Enzymen geschnitten. Die Ergebnisse der drei Restriktionsanalysen waren übereinstimmend und zeigten, dass alle 31 Individuen die homozygote SNP-Variante CC hatten. Der letzte SNP rs74045080 wurde mit dem Restriktionsenzym *CviKI* analysiert. Die Restriktionsanalyse bei den untersuchten 31 DNA-Proben zeigte, dass sowohl die Probanden als auch die Responder und Therapieversager den homozygoten Genotypen CC hatten. Zusammenfassend ist bei den letzten vier SNPs, rs5772027, rs3841266, rs112029659 und rs74045080 kein Unterschied zwischen Probanden und Respondern und Therapieversager nachweisbar.

Tab. 20: Zusammenfassung der RFLP-Analyse mit den verwendeten Restriktionsenzymen von fünf SNPs bei insgesamt 31 untersuchten Individuen

SNP	Restriktions-enzym	Norm (n=11)			Responder (n=10)			Therapieversager (n=10)		
		n=11	n=0	n=0	n=9	n=1	n=0	n=8	n=2	n=0
rs2341365 [A/G]	<i>MwoI/FauI</i>	n=11 [A/A]	n=0 [A/G]	n=0 [G/G]	n=9 [A/A]	n=1 [A/G]	n=0 [G/G]	n=8 [A/A]	n=2 [A/G]	n=0 [G/G]
rs5772027 [-/A]	<i>MseI</i>	n=0 [-/-]	n=0 [-/A]	n=11 [A/A]	n=0 [-/-]	n=0 [-/A]	n=10 [A/A]	n=0 [-/-]	n=0 [-/A]	n=10 [A/A]
rs3841266 [-/T]	<i>PsiI</i>	n=0 [-/-]	n=0 [-/T]	n=11 [T/T]	n=0 [-/-]	n=0 [-/T]	n=10 [T/T]	n=0 [-/-]	n=0 [-/T]	n=10 [T/T]
rs112029659 [C/T]	<i>HhaI/HinpI/ BstUI</i>	n=11 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]	n=10 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]	n=10 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]
rs74045080 [C/T]	<i>CviKI</i>	n=11 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]	n=10 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]	n=10 [C/C]	n=0 [C/T]	n=0 [T/T]

Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Probanden bzw. Norm (blau), Responder (grün) und Therapieversager (rot) markiert. SNP mit einem Polymorphismus ist mit rot umrahmt.

III.1.2 Genotypisierung der SNPs mit konventioneller Sequenzierung

III.1.2.1 Genotypisierung von SNP rs4615788 [C/G] mittels konventioneller Sequenzierung

Anhand des SNPs rs4615788 wird im Folgenden die Genotypisierung mit der konventionellen Sequenzierungs-Technik erklärt. Der DNA-Abschnitt im *ISG15*-Promotor mit dem SNP rs4615788 wurde in einer PCR amplifiziert. Das synthetisierte PCR-Produkt wies eine Größe von 152 bp auf. Die konventionelle Sequenzierung des PCR-Produkts erfolgte im Institut für Humangenetik am Uniklinikum Essen. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.01 (Technelysium) manuell ausgewertet. Als Ausdruck erhielt man eine vierfarbige Sequenz, in der jede der vier Farben einer Base (A, T, G oder C) entspricht. Für die 31 untersuchten DNA-Proben sind in den Abbildungen 7 und 8 beispielhaft die Chromatogramme von zwei DNA-Proben, eines gesunden Probanden und eines HCV-Patienten (Responder), dargestellt.

Gesunder Proband: D (vorwärts)

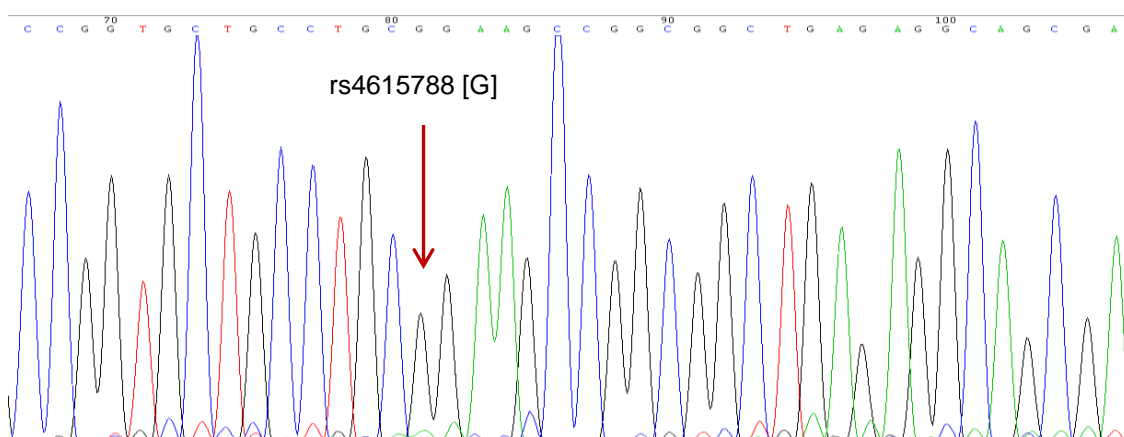
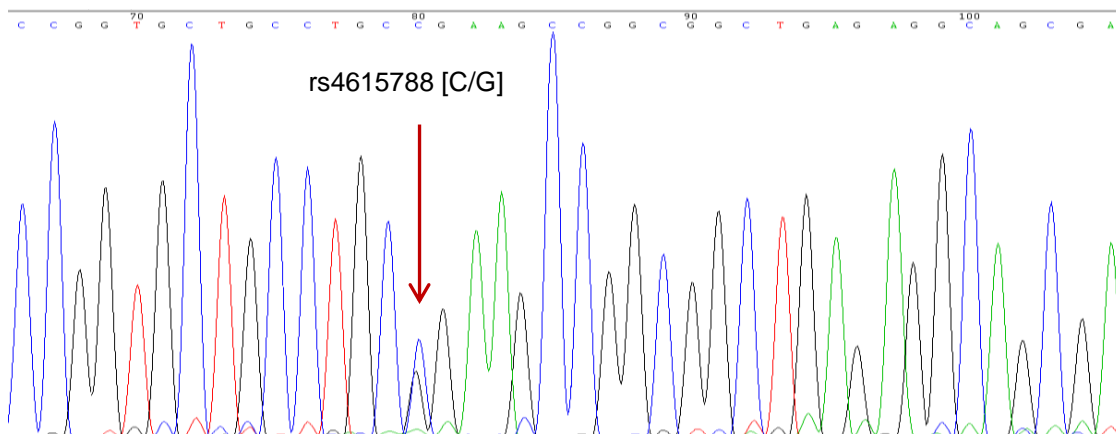
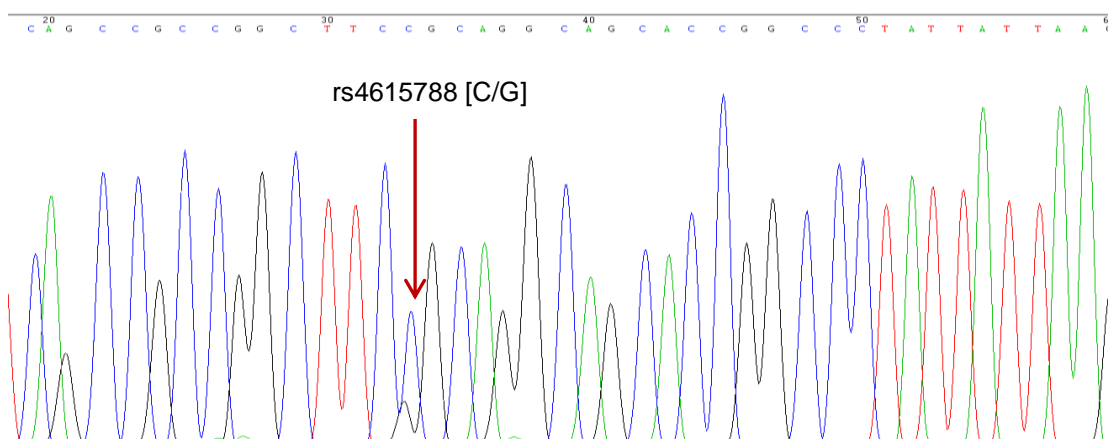


Abb. 7: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis des gesunden Probanden D.

Sequenzierung erfolgte mit dem vorwärts Oligonukleotid, ISG15PromBF. Der rote Pfeil markiert die Position des SNPs rs4615788.

Die Abbildung 7 zeigt einen Ausschnitt aus dem Chromatogramm des gesunden Probanden D. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in Leserichtung 5' → 3'. Dem Chromatogramm ist zu entnehmen, dass der SNP rs4615788 ein G enthält. Bei der gleichen Patientenprobe wurde auch der Gegenstrang sequenziert, indem das Chromatogramm ein zum vorherigen G komplementäres C zeigte. Dieses Ergebnis entspricht dem homozygoten Genotypen GG.

A) HCV-Patient 3: (vorwärts)**B) HCV-Patient 3: (rückwärts)****Abb. 8: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis des HCV-Patienten 3.**

A) Sequenzierung mit dem Vorwärts-Oligonukleotid, ISG15PromBF. B) Sequenzierung mit dem Rückwärts-Oligonukleotid, ISG15PromBR.

In Abbildung 8A ist das Chromatogramm eines HCV-Patienten (Patient 3) mit der Leserichtung 5'→3' dargestellt. Im Gegensatz zum in Abb. 7 dargestellten Chromatogramm weist diese DNA-Probe an der gleichen Stelle der DNA-Sequenz zwei fast gleich große Peaks auf, jeweils ein Signal für ein C (Cytosin) und ein G (Guanin). Das entspricht dem heterozygoten Genotyp CG. Zur Bestätigung des Sequenzierungsergebnisses ist in der Abbildung 8B das Chromatogramm des dazugehörigen komplementären DNA-Abschnitts (rückwärts) dargestellt. Es konnte bestätigt werden, dass der HCV-Patient 3 den heterozygoten Genotyp CG besitzt. Die Sequenzierungsergebnisse der 31 untersuchten Probanden- und Patientenproben sind im nächsten Abschnitt (Tab. 21) zusammengefasst.

III.1.2.2 Zusammenfassung der Genotypisierung aller SNPs mit konventioneller Sequenzierung

Die SNPs rs4615788, rs116046129, rs72502744, rs59308546, rs35478934 und rs113047134 wurden mit konventioneller Sequenzierung analysiert. Die Ergebnisse der 31 untersuchten DNA-Proben (siehe II.5.2.1 Tab. 2) sind der Tabelle 21 zu entnehmen. Im Fall des SNPs rs4615788 wurde in allen DNA-Proben des Probanden-Kollektivs (n=11) der homozygote Genotyp GG nachgewiesen. In dem Responder-Kollektiv hatten von zehn untersuchten DNA-Proben, neun den homozygoten Genotypen GG und eine DNA-Probe (Patient 3) wies den heterozygoten Genotypen CG auf. In den zehn DNA-Proben des Therapieversager-Kollektivs wurde bei acht DNA-Proben der Genotyp GG und bei zwei DNA-Proben (Patient 11 und 16) die heterozygote Variante CG identifiziert. Somit zeigten nur drei DNA-Proben (HCV-Patienten 3, 11 und 16) einen Polymorphismus in diesem SNP. Zusammengefasst kommt der Polymorphismus in den 31 untersuchten DNA-Proben interessanterweise nur innerhalb des HCV-Patientenkollektivs und nicht in den Probanden-DNAs des Norm-Kollektivs vor. Bei den HCV-Patienten 3, 11 und 16 handelt es sich sowohl um Responder als auch um Therapieversager, sodass keine Korrelation dieses Polymorphismus mit dem Nicht-Ansprechen auf die antivirale Therapie bei HCV-Patienten identifiziert wurde.

Die Sequenzierung des SNPs rs116046129 ergab, dass alle 31 Individuen die homozygote SNP-Variante TT enthielten. Bei der Analyse der SNPs rs72502744, rs59308546, rs35478934 wurde bei allen 31 Individuen als SNP eine Deletion (-/-) in beiden Allelen nachgewiesen. Dabei handelt es sich um eine homozygote Deletion. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung des SNPs rs113047134 zeigte in den untersuchten 31 DNA-Proben, dass sowohl die Probanden als auch die Responder und Therapieversager den homozygoten Genotypen AAC/AAC besitzen. Somit lässt sich zusammenfassen, dass bei den SNPs rs116046129, rs72502744, rs59308546, rs35478934 und rs113047134 kein Polymorphismus zwischen den untersuchten gesunden Probanden, Respondern und Therapieversagern identifiziert wurde. Interessanterweise kommt bei allen SNPs, die mit der konventionellen Sequenzierung analysiert wurden, keine genetische Variation im untersuchten Probanden-Kollektiv vor. Falls ein Polymorphismus auftritt, dann nur innerhalb des HCV-Kollektivs zwischen Respondern und Therapieversagern wie im Fall des SNPs rs4615788.

Tab. 21: Zusammenfassung der Sequenzierungs-Analyse von sechs SNPs bei insgesamt 31 untersuchten Individuen

SNP	Norm (n=11)			Responder (n=10)			Therapieversager (n=10)		
rs4615788 [C/G]	n=0 [C/C]	n=0 [C/G]	n=11 [G/G]	n=0 [C/C]	n=1 [C/G]	n=9 [G/G]	n=0 [C/C]	n=2 [C/G]	n=8 [G/G]
rs116046129 [C/T]	n=0 [C/C]	n=0 [C/T]	n=11 [T/T]	n=0 [C/C]	n=0 [C/T]	n=10 [T/T]	n=0 [C/C]	n=0 [C/T]	n=10 [T/T]
rs72502744 [-/CAA]	n=11 [-/-]	n=0 [-/CAA]	n=0 [CAA/ CAA]	n=10 [-/-]	n=0 [-/CAA]	n=0 [CAA/ CAA]	n=10 [-/-]	n=0 [-/CAA]	n=0 [CAA/ CAA]
rs59308546 [-/ACAA]	n=11 [-/-]	n=0 [-/ ACAA]	n=0 [ACAA/ ACAA]	n=10 [-/-]	n=0 [-/ ACAA]	n=0 [ACAA/ ACAA]	n=10 [-/-]	n=0 [-/ ACAA]	n=0 [ACAA/ ACAA]
rs35478934 [-/AAC]	n=11 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=0 [AAC/ AAC]	n=10 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=0 [AAC/ AAC]	n=10 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=0 [AAC/ AAC]
rs113047134 [-/AAC]	n=0 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=11 [AAC/ AAC]	n=0 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=10 [AAC/ AAC]	n=0 [-/-]	n=0 [-/AAC]	n=10 [AAC/ AAC]

Ergebnisse der Restriktionsanalyse der Probanden bzw. Norm (blau), Responder (grün) und Therapieversager (rot) markiert. SNP mit einem Polymorphismus ist mit rot umrahmt.

III.1.3 Genotypisierung von SNP rs60637872 [CAA/-] mit zwei unterschiedlichen Sequenzierungs-Methoden

III.1.3.1 Untersuchung von SNP rs60637872 mit der konventionellen Sequenzierung

Die Genotypisierung des SNPs rs60637872 erfolgte zunächst mit konventioneller Sequenzierung. Der für die Untersuchung amplifizierte DNA-Abschnitt betrug eine Größe von 228bp mit der Deletion - bzw. 231bp mit CAA als SNP. Die konventionelle Sequenzierung des PCR-Produkts mit dem SNP rs60637872 erfolgte im Institut für Humangenetik. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Sequenzierungsergebnisse des gesunden Probanden C und des HCV-Patienten 3. Dem Chromatogramm des gesunden Probanden C ist zu entnehmen, dass der SNP rs60637872 das Triplet CAA enthält (Abb. 9). Bei der Sequenzierung des Gegenstranges dieser DNA-Probe wurde im SNP ein komplementäres TTG identifiziert. Demzufolge hat diese DNA-Probe den homozygoten Genotyp CAA/CAA. Im Gegensatz dazu ist das Sequenzierungsergebnis des HCV-Patienten 3 schwierig zu lesen (Abb. 10), sodass das Ergebnis mit dieser Sequenzierungsmethode

Ergebnisse

unklar bleibt. Interessanterweise zeigten auch die DNAs der HCV-Patienten 11 und 16 sowohl in 5'→3'- als auch in 3'→5'-Leserichtung ein nicht eindeutiges Sequenzierungsergebnis. Die Chromatogramme der drei DNA-Proben der HCV-Patienten 3, 11 und 16 waren an der Stelle des SNPs sehr ähnlich, wodurch technische Probleme bei der Sequenzierungsreaktion ausgeschlossen werden konnten.

Gesunder Proband: C (vorwärts)

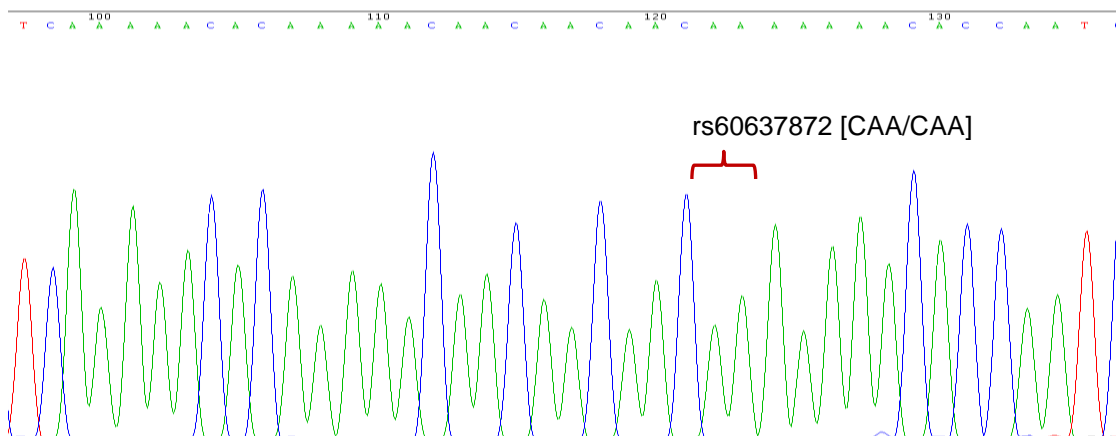


Abb. 9: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis des gesunden Probanden C.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Vorwärts-Oligonukleotid, ISG15PromGF. Die rote Klammer markiert die Position des SNPs rs6063782.

HCV-Patient 3: (vorwärts)

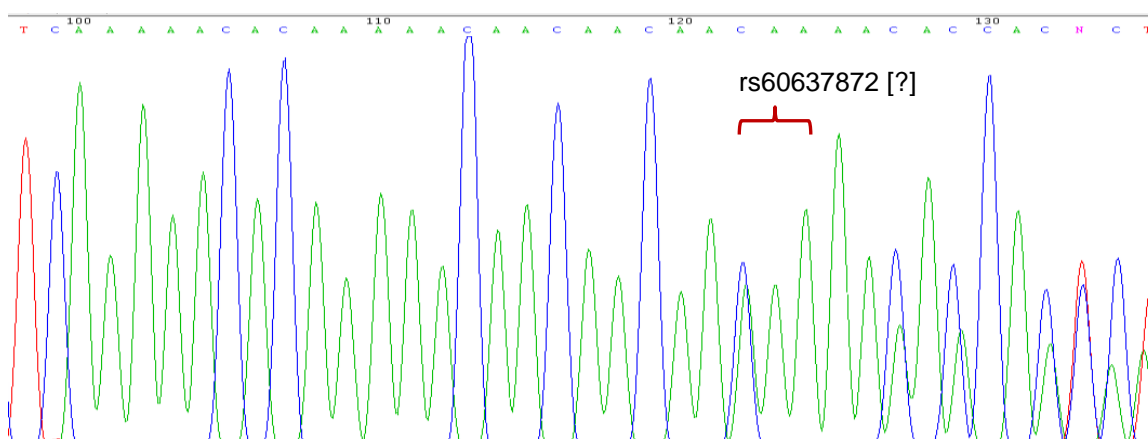


Abb. 10: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis des HCV-Patienten 3.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Vorwärts-Primer, ISG15PromGF mit deutlicher Mehrdeutigkeit der Sequenz im Bereich des SNPs und nach dem SNP. Die rote Klammer markiert die Position des SNPs rs6063782.

Die Abbildung 11 zeigt die DNA-Sequenz mit der SNP-Variante CAA (rot) und darunter ist die DNA-Sequenz mit der Deletion - im SNP (grün). Durch diese Darstellung der beiden DNA-Sequenzen wird deutlich, dass sich durch die Deletion des Triplets CAA die nachfolgenden Basen in der Sequenz um drei Positionen in 5'-Richtung (5'→3') nach vorne verschieben. Bei den nachfolgenden Basen handelt es sich um die gleichen Basen wie bei der oberen DNA-Sequenz nach dem CAA. Demzufolge weist die DNA-Sequenz des HCV-Patienten 3 eine Überlagerung der beiden Allele auf, wobei ein Allel das Basentriplett CAA und das andere Allel eine Deletion - im SNP enthält. Das entspricht dem heterozygoten Genotypen CAA/-. Diese Heterozygotie im SNP rs60637872 zeigten, wie zuvor beschrieben, auch die DNA-Proben der HCV-Patienten 11 und 16 mit gleichem Muster.

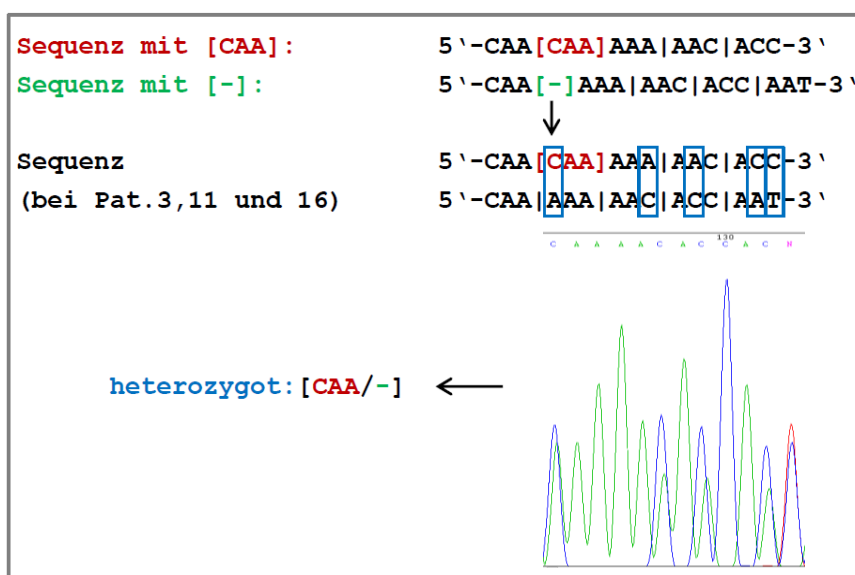


Abb. 11: Schematischer Überblick über die DNA-Sequenzen mit den verschiedenen SNP-Varianten.

Die Sequenz mit dem Triplett [CAA] (rot) und die Sequenz mit der Deletion [-] (grün) gekennzeichnet. Darunter ist Ausschnitt aus dem Chromatogramm des HCV-Patienten 3 dargestellt, wobei die blauen Kästen auf die Basenverschiebung hinweisen, die theoretisch durch die heterozygote Deletion verursacht wird.

III.1.3.2 Untersuchung von SNP rs60637872 mit der Pyrosequenzierung

Zur Bestätigung der mittels konventioneller Sequenzierung gefundenen Heterozygotie im SNP rs60637872 wurden die 31 Probanden- und HCV-Patienten-Proben zusätzlich mit einer weiteren Sequenzierungs-Technik, der Pyrosequenzierung, überprüft. Die Pyrosequenzierung ist eine exakte Sequenzierungs-Methode, die sich insbesondere zur Sequenzierung von repetitiven DNA-Sequenzen eignet, wie im Fall des SNPs rs60637872. Anders als bei der konventionellen Sequenzierung erzeugt der Einbau eines Nukleotids ein Lichtsignal (*Peak*), dessen Höhe proportional zu der Anzahl der eingefügten Nukleotide ist.

Ergebnisse

Der amplifizierte DNA-Abschnitt mit dem SNP rs60637872 hatte eine Länge von 111bp. Bei der Pyrosequenzierung diente der biotinylierte DNA-Einzelstrang (vorwärts) mit der 5'→3'-Leserichtung als Matrize für die Synthese des Gegenstranges (Abb.12). Der Gegenstrang wurde in 3'→5'-Orientierung sequenziert (Abb.12). Die sequenzierte Nukleotid-Abfolge lautet 5'-GTTTTT[TTG]TTGTTGTTGTTTTTGT-3'.

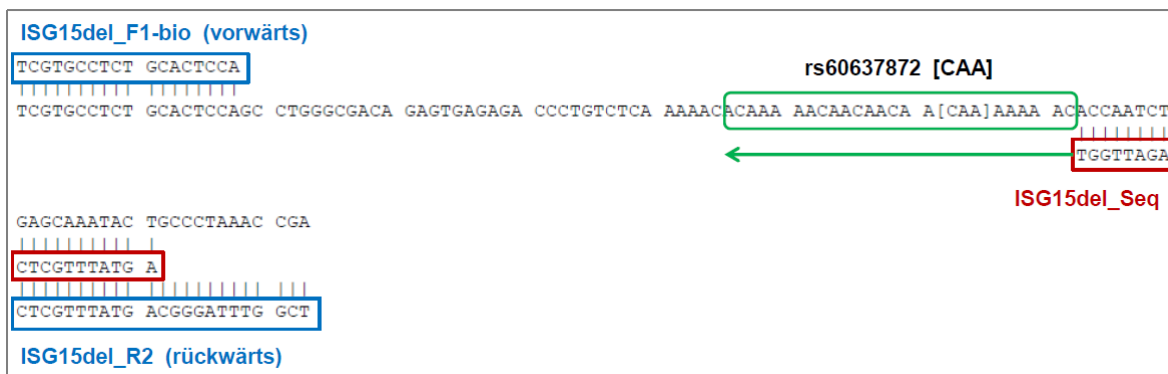


Abb. 12: Ausgewählte DNA-Sequenz mit dem SNP rs60637872.

Die DNA-Sequenz ist in 5'→3'-Leserichtung mit Vorwärts-Oligonukleotid, ISG15del_F1-bio und Rückwärts-Oligonukleotid, ISG15del_R2 (blauer Kasten) dargestellt. Die Pyrosequenzierung erfolgte mit dem Sequenzier-Oligonukleotid, ISG15del_Seq (roter Kasten). Der grüne Pfeil zeigt die Sequenzierungsrichtung in 3'→5' an. Der zu analysierende DNA-Bereich mit dem SNP rs60637872 [CAA/-] (grüner Kasten) hervorgehoben.

Die Auswertung der Rohdaten (Pyrogramme) erfolgte mit der PyroMark® Q24 Software. Das Vorkommen der jeweiligen SNP-Variante wurde von der Software berechnet und ist im Pyrogramm in Prozent angegeben. Im Fall eines homozygoten Genotypen TTG/TTG wird bis zu 95% der SNP TTG angezeigt. Beim heterozygoten Genotypen TTG/--- werden idealerweise mit ca. 50% beide SNP-Varianten nachgewiesen. Die homozygote Deletion ---/--- wird mit ca. 95% identifiziert.

In den Abbildungen 13 und 14 sind von den 31 analysierten Proben exemplarisch die Pyrogramme der DNA-Proben des gesunden Probanden C und des HCV-Patienten 3 dargestellt. Das Pyrogramm der Probe des gesunden Probanden zeigte, dass mit 95% der SNP TTG und mit 5% der SNP --- nachgewiesen wurde (Abb. 13) und entspricht dem homozygoten Genotypen TTG/TTG. Zusätzlich zum errechneten Ergebnis ist im Pyrogramm die Nukleotid-Abfolge 5'-GTTTTT[TTG]TTGTTGTTGTTTTTGT-3' zu sehen. Anhand der Höhe der *Peaks* rechnet die Software die Anzahl der gleichen hintereinander eingebauten Nukleotide aus (Abb. 13). Demnach entspricht der erste *Peak* einem eingebauten Guanin (G). Die Höhe des zweiten *Peaks* entspricht

Ergebnisse

sieben hintereinander vorkommenden Thyminen (T). Die genaue Berechnung der Anzahl der Nukleotide erfolgt durch die Software und wird über ein zusätzliches Histogramm dargestellt (Daten nicht gezeigt). Der dritte *Peak* steht für ein G. Der SNP TTG befindet sich im zweiten und im dritten *Peak* und ist in der Nukleotid-Sequenz unterhalb des Pyrogramms rot gekennzeichnet. Der vierte *Peak* zeigt zwei T und der fünfte entspricht einem G. Anschließend zeigt die Sequenzierung die der Sequenz entsprechende Abfolge ab TTG.

Gesunder Proband C

→ homozygote Genotyp **TTG**: 5'-GTTTTTT**TTG**TTGTTGTTGTTTTTGT-3'

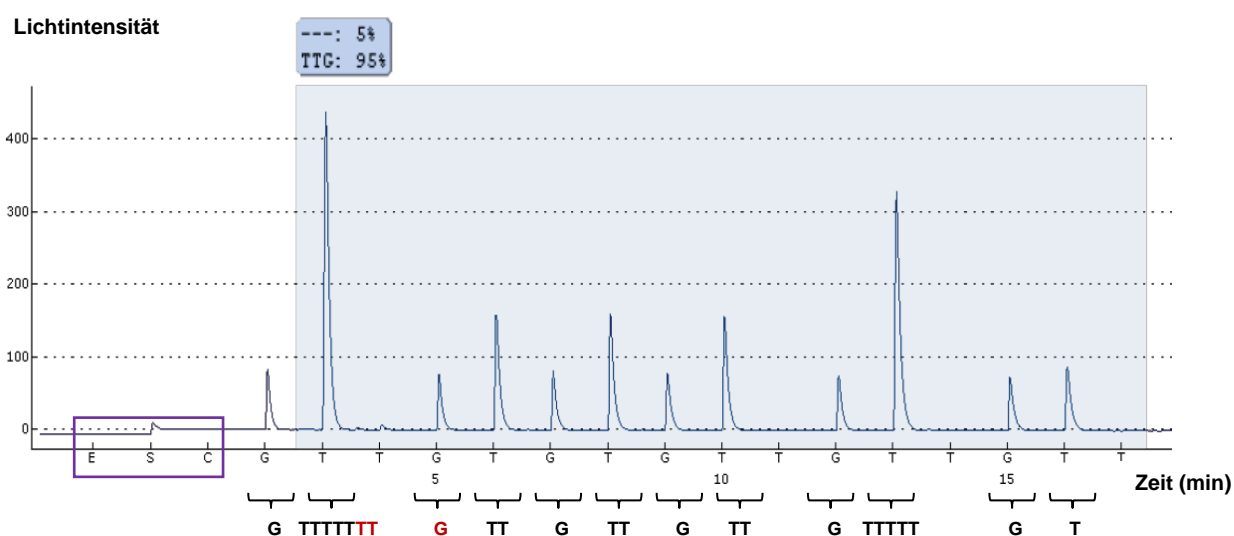


Abb. 13: Pyrogramm des gesunden Probanden C.

Pyrosequenzierung erfolgte mit Sequenzier-Primer, ISG15del_Seq. Die X-Achse zeigt die Nukleotid-Abfolge der zu sequenzierenden DNA-Region (blau unterlegt) und darunter die Zeit in Minuten an. Y-Achse zeigt die relativen Lichteinheiten. Die Höhe des Peaks entspricht ca. der Anzahl der eingefügten Nukleotide. Bei zwei oder mehr gleichen hintereinander folgenden Nukleotiden ist die Höhe des *Peaks* doppelt so hoch oder höher als der *Peak* von einem Nukleotid. Am Anfang des Pyrogramms sind folgende interne Kontrollen (violetter Kasten) dargestellt: als Negativ-Kontrolle nur das Enzym-Mix (E), als Positiv-Kontrolle das Enzym-Mix mit dem Substrat (S) und als weitere Negativ-Kontrolle ein nicht zur Sequenzabfolge komplementäres Nukleotid (C). Beide Negativ-Kontrollen zeigen keine *Peaks*, nur bei der Positiv-Kontrolle ist ein Lichtsignal nachweisbar. Anschließend ist die sequenzierte Nukleotid-Abfolge mit den SNP TTG (rot) dargestellt. Das von der Software berechnete Ergebnis (blauer Kasten) ist über dem Pyrogramm dargestellt.

Bei der Probe des HCV-Patienten 3 wurde mit 51% die Deletion des Tripletts --- und mit 49% die Variante TTG berechnet und somit beide Allele nachgewiesen. Dieses Resultat entspricht dem

heterozygoten Genotypen TTG/--- (Abb. 14). Obwohl der SNP am Anfang des Pyrogramms vorkommt, ist die durch Heterozygotie bedingte Basenverschiebung in diesem repetitiven Bereich erst am Ende des Pyrogramms der HCV-Patienten-Probe erkennbar. Die Überlagerung der beiden Allele zeigt daher ein anderes *Peak*-Muster am Ende des Pyrogramms. Die Höhe der unterschiedlichen Peaks ergibt sich somit aus der Summe der *Peak*-Höhe der beiden Varianten, Variante TTG (Sequenz A) und --- (Sequenz B). Übersichtswise sind die unterschiedlichen *Peaks* im Pyrogramm des HCV-Patienten mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

HCV-Patient 3

→ heterozygote Genotyp **TTG/---**:

A) Sequenz mit **TTG**: 5-'GTTTTTT**TTG**TTGTTGTTGTTTTTGT-3'

B) Sequenz mit **---**: 5-'GTTTTT**---**TTGTTGTTGTTTTTGT-3'

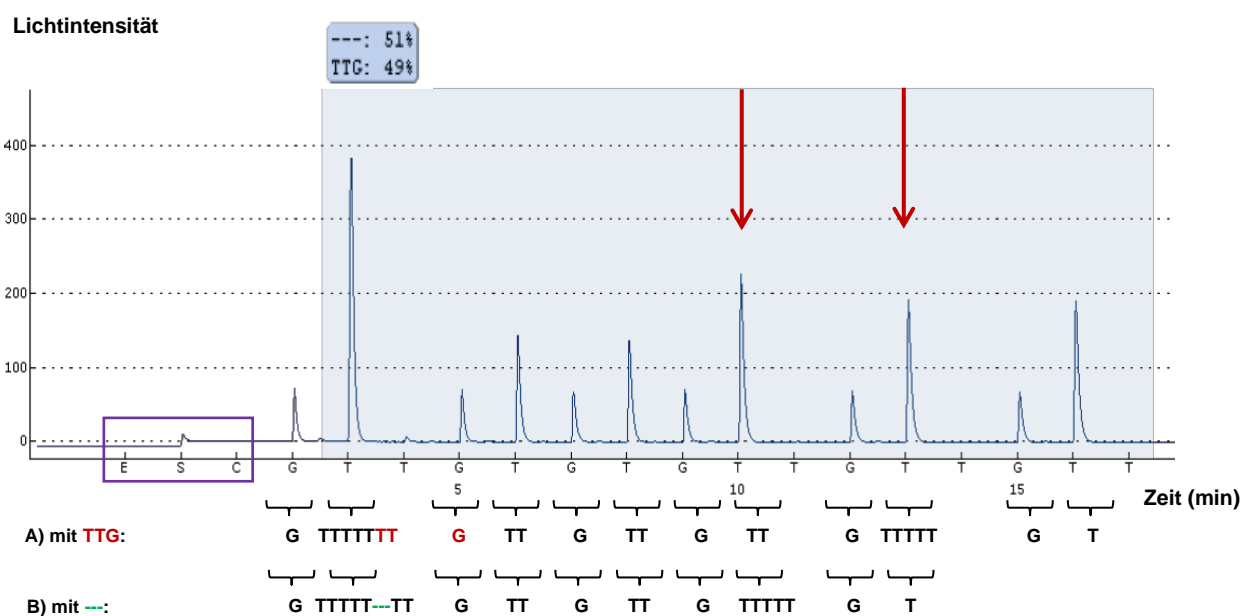


Abb. 14: Pyrogramm des HCV-Patienten 3.

Pyrosequenzierung erfolgte mit Sequenzier-Primer, ISG15del_Seq. Die X-Achse zeigt die Nukleotid-Abfolge der zu sequenzierenden DNA-Region (blau unterlegt) und darunter die Zeit in Minuten an. Y-Achse zeigt die relativen Lichteinheiten. Am Anfang des Pyrogramms sind folgende interne Kontrollen (violetter Kasten) dargestellt: als Negativ-Kontrolle nur das Enzym-Mix (E), als Positiv-Kontrolle das Enzym-Mix mit dem Substrat (S) und als weitere Negativ-Kontrolle ein nicht zur Sequenzabfolge komplementäres Nukleotid (C). Beide Negativ-Kontrollen zeigen keine *Peaks*, nur bei der Positiv-Kontrolle ist ein Lichtsignal nachweisbar. Rote Pfeile zeigen auf die Positionen, die sich durch die heterozygote SNP-Variante des HCV-

Patienten 3 von homozygoten Genotypen des Probanden unterscheiden. Nach den Kontrollen ist die sequenzierte Nukleotid-Abfolge dargestellt. Unter dem Pyrogramm ist A) die Sequenz mit der Variante TTG und B) die Sequenz mit der Variante --- zu sehen. Das von der Software berechnete Ergebnis (blauer Kasten) ist über dem Pyrogramm dargestellt.

III.1.3.3 Zusammenfassung der Genotypisierung von SNP rs60637872

Der SNP rs6063787231 wurde bei 31 Probanden- und HCV-Patienten-Proben mit der konventionellen Sequenzierung und der Pyrosequenzierung analysiert. Die Ergebnisse beider Sequenzierungsmethoden waren übereinstimmend und sind in der Tabelle 22 zusammengefasst. Bei allen elf DNA-Proben des Probanden-Kollektivs wurde nur der homozygote Genotyp TTG/TTG bzw. CAA/CAA identifiziert. Im HCV-Kollektiv zeigten dagegen einige HCV-Patienten einen Polymorphismus. Von zehn Responder-Proben hatten neun den homozygoten Genotypen CAA/CAA und eine Responder-Probe (HCV-Patient 3) den heterozygoten Genotypen TTG/--- (CAA/---). In den zehn Therapieversager-Proben wurde bei acht Proben der Genotyp CAA/CAA und bei zwei Proben (Patient 11 und 16) die heterozygote SNP-Variante CAA/--- gefunden. Zusammengefasst wiesen von den 31 DNA-Proben nur die DNAs der HCV-Patienten 3, 11 und 16 den heterozygoten Genotypen CAA/--- auf. Der Polymorphismus scheint daher häufiger im HCV-Kollektiv als im Probanden-Kollektiv aufzutreten. Interessanterweise hatte keiner der 31 untersuchten Proben die homozygote Deletion ---/---. Somit wurden auch bei SNP rs60637872 von drei möglichen Genotypen nur zwei Genotypen nachgewiesen.

Tab. 22: Zusammenfassung der Analyse des SNPs rs60637872 bei 31 DNA-Proben

SNP	Norm (n=11)			Responder (n=10)			Therapieversager (n=10)		
	n=11	n=0	n=0	n=9	n=1	n=0	n=8	n=2	n=0
rs60637872 [CAA/---]	[CAA/ CAA]	[CAA/ ---]	[---/ ---]	[CAA/ CAA]	[CAA/ ---]	[---/ ---]	[CAA/ CAA]	[CAA/ ---]	[---/ ---]

Ergebnisse der Analyse der Probanden bzw. Norm (blau), Responder (grün) und Therapieversager (rot) markiert.

III.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aller SNPs bei der kleinen Probanden- und Patientenanzahl

In dieser Arbeit wurden zwölf SNPs im Promotorbereich des *ISG15*-Gens in einer kleinen Kohorte von 31 DNA-Proben, elf Probanden- und 20 HCV-Patienten-Proben verblindet (II.5.2.1 Tab. 2)

analysiert. Die Ergebnisse der zwölf analysierten SNPs lassen sich wie folgt zusammenfassen. Von den zwölf SNPs wurde bei neun SNPs (rs5772027, rs3841266, rs112029659, rs74045080, rs116046129, rs72502744, rs59308546, rs35478934 und rs113047134) keine genetische Variation in dem untersuchten Probanden- und HCV-Kollektiv identifiziert. Nur drei der zwölf SNPs, rs4615788, rs2341365 und rs60637872 zeigten einen Polymorphismus. Erstens war auffällig, dass die elf untersuchten Probanden-Proben keinen Polymorphismus (0%) aufwiesen, aber im HCV-Kollektiv bei drei (15%) der 20 HCV-Patienten-Proben eine genetische Variation bei diesen drei SNPs gefunden wurde. Interessanterweise zeigten nur die Proben der HCV-Patienten 3, 11 und 16 stets eine Heterozygotie in den drei SNPs, rs4615788, rs2341365 und rs60637872. Zusammengefasst tritt dieser Polymorphismus nur im HCV-Kollektiv auf und zwar bei einer Responder-Probe (HCV-Patient 3) sowie bei zwei Therapieversager-Proben (HCV-Patienten 11 und 16). Daher ist in der kleinen Kohorte eine Tendenz zu erkennen, dass die Heterozygotie etwas häufiger im Kollektiv der Therapieversager als im Responder-Kollektiv vorkommt. Allerdings geben die Ergebnisse keinen Anhaltspunkt für eine Korrelation dieser drei SNPs mit dem Ansprechen oder Nicht-Ansprechen auf die antivirale Therapie.

Zweitens zeigte die Genotypisierung der drei SNPs, dass der heterozygote Polymorphismus des SNPs rs4615788 bei den HCV-Patienten-Proben 3, 11 und 16 immer zusammen mit dem heterozygoten Genotyp der beiden SNPs rs2341365 und rs60637872 auftrat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei heterozygoten Polymorphismen in (genetischer) Assoziation zueinander vorliegen und vermutlich miteinander gekoppelt sind. Deshalb wurde im Folgenden von diesen drei SNPs der SNP rs60637872 als repräsentativer SNP ausgewählt, um ein größeres Kollektiv an Probanden- und HCV-Patienten-Proben mit der Pyrosequenzierung zu analysieren. Drittens zeigten die Untersuchungen der drei SNPs, dass bei keinem der SNPs alle drei Genotypen sondern nur zwei nachweisbar waren, was möglicherweise auf eine geringe Variabilität dieser SNPs hindeutet.

III.2. Genotypisierung von SNP rs60637872 in einer größeren Kohorte von HCV-Patienten mittels Pyrosequenzierung

Die Untersuchung des SNPs rs60637872 bei einer größeren Kohorte von Probanden- und HCV-Patienten-Proben erschien sinnvoll, da in der zuvor beschriebenen Analyse ein tendenziell häufigeres Vorkommen der Heterozygotie (15%) im Hepatitis-C-Kollektiv gefunden wurde.

Für die Untersuchung der großen Kohorte wurden die DNA-Proben von 31 Probanden und 127 HCV-Patienten verwendet (siehe II.5.2.2 Tab. 3). Die Pyrosequenzierung dieser Proben erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie im Abschnitt III.1.3.2 detailliert dargestellt. Aus dieser Analyse geht hervor, dass im Norm-Kollektiv 30 (96,8%) der 31 untersuchten Proben den

homozygoten Genotypen CAA/CAA besaßen und nur eine (3,2%) Probe die heterozygote Deletion CAA/--- (Tab. 23) aufwies. Im HCV-Kollektiv wurde von 127 analysierten HCV-Patienten-Proben bei 112 (88,2%) Proben die homozygote SNP-Variante CAA/CAA und bei 15 (11,8%) Proben die heterozygote Variante CAA/--- nachgewiesen (Tab. 23). Eine homozygote Deletion ---/--- wurde auch in der größeren Kohorte nicht nachgewiesen. Zusammenfassend kommt die heterozygote Variante bei mehr als dreimal so vielen HCV-Patienten (11,8%) im Vergleich zum Norm-Kollektivs (3,2%) vor.

Tab. 23: Zusammenfassung der Genotypisierung des SNPs rs60637872 bei großen Kohorte.

	Genotyp CAA/CAA	Genotyp CAA/---	Genotyp ---/---
Norm-Kollektiv (n=31)	30 (96,8%)	1 (3,2%)	- (0%)
HCV-Kollektiv (n=127)	112 (88,2%)	15 (11,8%)	- (0%)

Pyrosequenzierungsergebnisse des Probanden-Kollektivs (n=31) und HCV-Patienten-Kollektivs (n=127). Die drei möglichen SNP-Genotypen des SNPs rs60637872, (CAA/CAA), (CAA/---) und (---/---) sind mit der prozentualen Verteilung in den beiden Kollektiven dargestellt.

Die Ergebnisse der kleinen und großen Kohorte wurden im Folgenden zusammengefasst. Es wurden insgesamt 147 HCV-Patienten-Proben und 42 Probanden-Proben (II.5.2.1 Tab. 2 und II.5.2.2 Tab. 3) untersucht. Eine von 42 (2,4%) Proben des Norm-Kollektivs wies die heterozygote Deletion CAA/--- auf (Tab. 24). Im Vergleich dazu wurde bei 18 (12,2%) HCV-Patienten-Proben die heterozygote Deletion CAA/--- identifiziert und bei 129 (87,8%) HCV-Patienten-Proben der homozygote Genotyp CAA/CAA. Somit besteht zwischen den Proben des Norm- und HCV-Patienten-Kollektivs mit den heterozygoten Genotypen ein Unterschied von ca. 10% beziehungsweise eine um das mehr als Fünffache erhöhte Häufigkeit in der Gruppe der HCV-Patienten.

Des Weiteren ist der Tabelle 24 zu entnehmen, dass die heterozygote Deletion in allen Gruppen der HCV-Patienten wie den Therapie-Respondern und Therapieversagern wie den Non-Respondern, Relapsern, HCV-Patienten mit einem virologischen Durchbruch und therapienaiven HCV-Patienten auftritt. Dabei kommt der heterozygote Genotyp am häufigsten in der Non-Responder-Kohorte (6/31 bzw. 19,4%) vor und damit mehr als doppelt so häufig als in der Gruppe der Responder (6/65 bzw. 9,2%), der Relapser (2/29 bzw. 6,9%) und der HCV-Patienten, die einen virologischen Durchbruch während der antiviralen Therapie hatten (1/8 bzw. 12,5%). Interessanterweise kommt die heterozygote Deletion in der analysierten therapienaiven HCV-

Patienten-Kohorte (3/14 bzw. 21,4%) ähnlich oft wie bei den Non-Respondern (6/31 bzw. 19,4%) vor. Der Grund dafür ist noch unklar und diese Verteilung könnte auch zufällig sein. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Heterozygotie tendenziell häufiger in der untersuchten Non-Responder-Kohorte und damit bei HCV-Patienten vorkommt, die kein Ansprechen auf die antivirale Therapie gezeigt haben. Allerdings sollte dabei berücksichtigt werden, dass die Anzahl der getesteten Proben in den jeweiligen Kohorten sehr unterschiedlich war (Tab. 24) und deshalb diese Ergebnisse nur tendenziell aussagekräftig sind. Interessanterweise wurde in allen Analysen der Genotyp mit der homozygoten Deletion ---/--- nicht nachgewiesen.

Tab. 24: Zusammenfassung der Genotypisierung des SNPs rs60637872 in kleinen und großen Kohorte von Probanden- und HCV-Patienten-Proben.

	Genotyp CAA/CAA	Genotyp CAA/---	Genotyp ---/---
Norm-Kollektiv (n=42)	41 (97,6%)	1 (2,4%)	- (0%)
gesund (n=32)	31 (96,9%)	1 (3,1%)	-
PBC (n=4)	4 (100%)	-	-
PSC (n=6)	6 (100%)	-	-
HCV-Kollektiv (n=147)	129 (87,8%)	18 (12,2%)	- (0%)
Responder (n=65)	59 (90,8%)	6 (9,2%)	-
Non-Responder (n=31)	25 (80,6%)	6 (19,4%)	-
Relapser (n=29)	27 (93,1%)	2 (6,9%)	-
Virologischer Durchbruch (n=8)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	-
therapienaiv (n=14)	11 (78,6%)	3 (21,4%)	-

Pyrosequenzierungsergebnisse des Norm-Kollektivs (n=42) und HCV-Patienten-Kollektivs (n=147). Das Norm-Kollektiv als Kontroll-Gruppe besteht aus Proben von gesunden Probanden, PBC-Patienten (PBC, primär biliäre Zirrhose) und PSC-Patienten (PSC, primär sklerosierende Cholangitis). Das HCV-Kollektiv besteht aus Proben von HCV-Respondern, HCV-Non-Respondern, Relapsen, HCV-Patienten mit einem virologischen Durchbruch (*break-through*) während der Therapie und therapienaiven HCV-Patienten. Die drei möglichen Genotypen des SNPs rs60637872, (CAA/CAA), (CAA/---) und (---/---) sind mit der prozentualen Verteilung in den jeweiligen Kollektiven dargestellt.

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der Heterozygotie und einigen klinischen Parametern besteht, wurde anhand vorliegender Daten aus früheren HCV-Studien der Virusgenotyp, die Viruslast und die GPT-Werte von HCV-Patienten mit bzw. ohne heterozygote Deletion miteinander verglichen (Tab. 25). In den untersuchten HCV-Patientengruppen mit bzw.

ohne heterozygote Deletion war der Altersdurchschnitt vergleichbar. Es besteht keine Korrelation zwischen den klinischen Parametern wie Viruslast (vor der antiviralen Therapie), GPT-Wert (vor Therapie) und dem Vorkommen der heterozygoten Deletion in den untersuchten Patienten. Interessanterweise ist in Bezug auf den HCV-Genotyp eine tendenziell unterschiedliche Verteilung zwischen HCV-Patienten mit bzw. ohne heterozygote Deletion zu sehen. In der analysierten HCV-Patienten-Kohorte war HCV-Genotyp 1 der häufigste Virus-Genotyp (n=105), aber die heterozygote Deletion wurde bei HCV-Patienten mit diesem GT nur bei 13,3% (n=14) nachgewiesen. Auch bei HCV-GT2-Patienten (n=7) wurde mit 14,3% (n=1) ein ähnliches Vorkommen der Heterozygotie wie bei HCV-GT1 beobachtet. Im untersuchten HCV-Kollektiv tritt der heterozygote Genotyp am häufigsten bei HCV-Patienten mit GT4 (n=8) mit 25% (n=2) auf. Allerdings ist die Anzahl der getesteten HCV-GT4-Patienten mit insgesamt 8 HCV-Patienten sehr klein, um aussagekräftig zu sein. Bei HCV-Patienten mit GT3 (n=26) wurde die heterozygote Deletion mit 3,8% (n=1) deutlich seltener nachgewiesen als bei den anderen HCV-Genotypen. Bei der Probe des einzigen GT5-HCV-Patienten wurde nur die homozygote Variante CAA/CAA identifiziert. Aussagen zur Häufigkeitsverteilung der Deletionsvariante können bei nur einem Patienten mit HCV-Genotyp 5 nicht gemacht werden. Zusammenfassend scheint eine Tendenz bezüglich der Verteilung der heterozygoten Deletion zwischen den HCV-Genotypen bei den getesteten HCV-Patienten zu bestehen, wobei auch in diesem Fall die Kohorten mit GT2, 3, 4 und 5 im Vergleich zu der Gruppe mit HCV-GT1-Patienten zu klein waren, um eindeutige Aussagen zu machen.

Tab. 25: Zusammenfassung der klinischen Parametern von HCV-Patienten mit homozygoten Genotyp (CAA/CAA) und HCV-Patienten mit dem heterozygoten Genotyp (CAA/---)

	Genotyp CAA/CAA	Genotyp CAA/---
Anzahl (n)	129	18
Geschlecht (m/w)	80 / 49	13 / 5
Alter	43,69 ± 10,0	44,75 ± 12,6
HCV-Genotyp (1 / 2 / 3 / 4 / 5)	91 / 6 / 25 / 6 / 1	14 / 1 / 1 / 2 / 0
Viruslast	9,19x10 ⁵ ± 1,16x10 ⁶	1,13x10 ⁶ ± 1,03x10 ⁶
GPT-Wert	100,98 ± 73,96	107,44 ± 88,6

Die Parameter wie Geschlecht, Alter, HCV-Genotyp, Viruslast (vor der antiviralen Therapie) und GPT-Wert (vor Therapie) sind mit ihrer jeweiligen Verteilung in HCV-Patienten mit homozygoten Genotyp (CAA/CAA) und HCV-Patienten mit dem heterozygoten Genotyp (CAA/---) dargestellt.

III.3 Analyse der DNA-Methylierung im humanen *ISG15*-Promotor mittels Pyrosequenzierung

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Methylierungsgrad von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden des *ISG15*-Promotors analysiert. Eine erhöhte Cytosin-Methylierung könnte zur Regulation der *ISG15*-Genexpression beitragen, indem sie eine Erniedrigung der Transkriptionsrate bewirkt und somit möglicherweise die unterschiedliche basale *ISG15*-Genexpression bei Non-Respondern und Respondern bedingt. In Abbildung 15 ist der zu analysierende Ausschnitt der humanen *ISG15*-Promotorsequenz mit den untersuchten CpG-Dinukleotiden (fett) dargestellt. Da nur kurze DNA-Abschnitte mit der Pyrosequenzierung analysiert werden können, wurde dieser DNA-Bereich in drei Abschnitte unterteilt, den CpG 5'-alternativ-, den CpG 3'-up- und den CpG 3'-down-Test (blauer -, roter- und grüner Kasten, Abb.15). Im Folgenden wird die Untersuchung der Cytosin-Methylierung im *ISG15*-Promotor anhand des CpG 3'-up-Tests (s. roter Kasten) beschrieben. Die Analyse dieser CpG-Dinukleotide war interessant, da sich die Nukleotide in direkter Nähe (stromaufwärts) der TATA-Box (pink) befinden. Es wurde genomische DNA von zehn gesunden Probanden und insgesamt 25 Hepatitis-C-Patienten (sieben Responder, neun Therapieversager und neun therapienaive HCV-Patienten) verwendet.



Abb. 15: Darstellung des analysierten, humanen *ISG15*-Promotors mit CpG-Dinukleotiden (5'→3'-Orientierung). Die GC-reiche Region im Promotorbereich des *ISG15*-Gens ist grau unterlegt. Dargestellt sind der CpG 5'-alternativ-Test (dunkelblauer Kasten), der CpG 3'-up-Test (roter Kasten) und der CpG 3'-down-Test (grüner Kasten) und die untersuchten CpG-Dinukleotide (fett). Die TATA-Box (pink) und das Start-Methionin (blau) sind farblich gekennzeichnet.

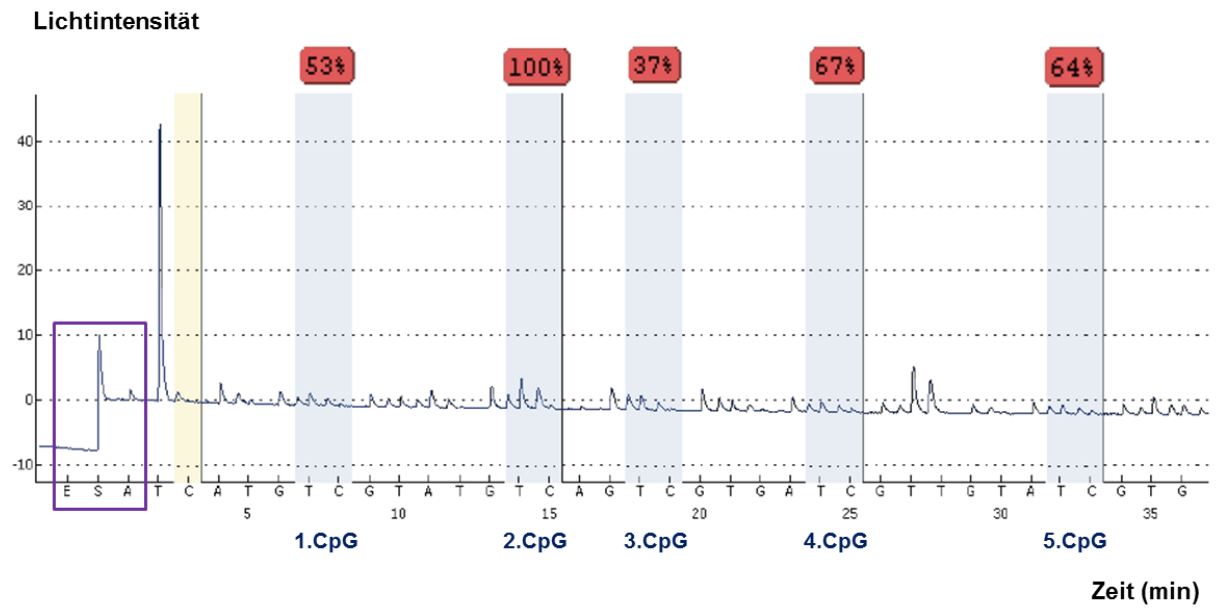
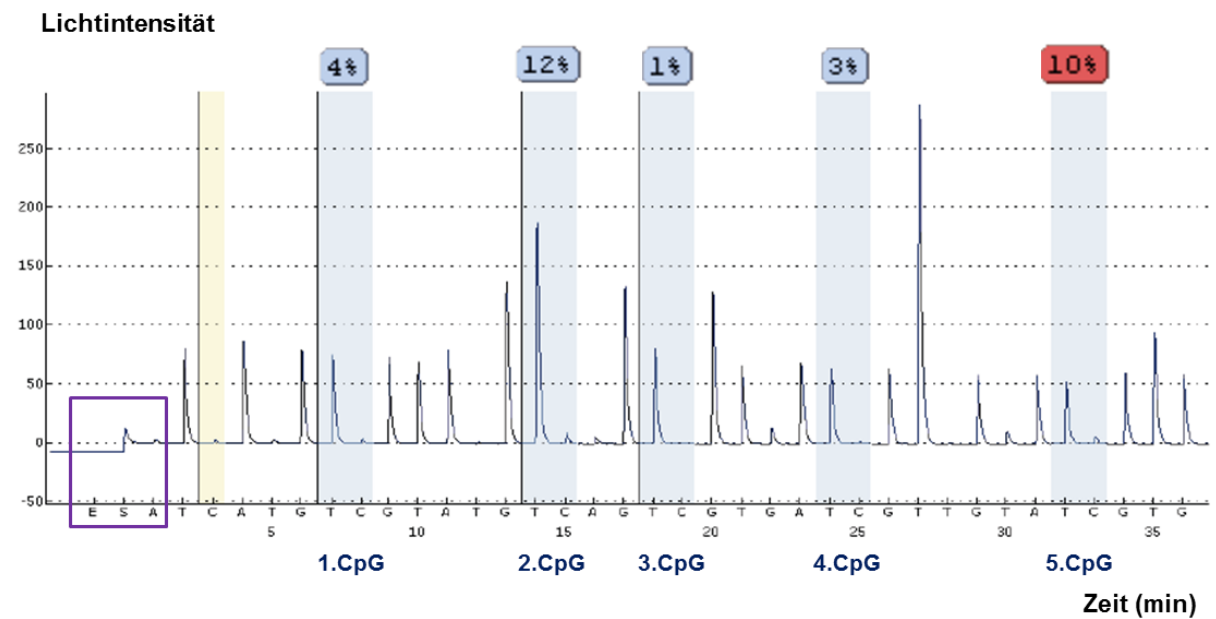
III.3.1 CpG 3'-up-Test zur Analyse der DNA-Methylierung im humanen *ISG15*-Promotor

Im CpG-3' up-Test wurde die Cytosin-Methylierung von fünf verschiedenen CpG-Dinukleotiden analysiert. Methylierte Cytosine, die während Bisulfit-Konvertierung unverändert blieben, werden weiterhin als C in der Sequenz nachgewiesen. Alle nicht methylierten Cytosine in der DNA-

Sequenz wurden nach der Bisulfit-Konvertierung zu Thyminen (T) umgewandelt. Das Vorhandensein beider Basen C/T in den CpG-Dinukleotiden wurde dann von der Software detektiert. Im Pyrogramm wurde das C/T-Verhältnis des Cytosins eines jeden CpG-Dinukleotids berechnet und der Methylierungsanteil in Prozent angegeben.

Zu Beginn wurden jeweils drei kommerziell erhältliche DNA-Kontrollproben (Qiagen) im CpG-3' up-Test analysiert. Das Pyrogramm in Abbildung 16A zeigt die nicht Bisulfit-konvertierte DNA-Kontrollprobe (Qiagen) und diente als Negativkontrolle. Bei dieser Kontrollprobe wurde eine geringe Signalhöhe mit unspezifischen *Peaks* beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass ohne vorherige Bisulfit-Konvertierung die zu sequenzierenden Basen nicht richtig detektiert werden konnten. In der Sequenz wurden außerdem aufgrund der fehlenden Bisulfit-Konvertierung falsch positive Methylierungs-Ergebnisse der untersuchten CpG-Dinukleotide angezeigt (siehe Prozentangaben im Pyrogramm). Abbildung 16B dagegen zeigt das Methylierungs-Ergebnis der Bisulfit-konvertierten, nicht methylierten DNA-Kontrollprobe (Qiagen). Hier wurden eindeutige Signale und eine normale Signalhöhe detektiert. Des Weiteren wurde am Anfang der Sequenz als interne Kontrolle zur Überprüfung der vollständigen Bisulfit-Konvertierung eine C-Base (hellgelb unterlegt) ausgewählt, der kein G folgt und die somit nicht in einem CpG-Dinukleotid liegt. Daher ist diese C-Base üblicherweise nicht methyliert und sollte nach Bisulfit-Konvertierung und PCR zu T umgewandelt sein. Man sieht an dieser Stelle kein *Peak* für ein C, sodass diese Cytosin-Base während der PCR-Reaktion vollständig zu T konvertiert wurde (siehe *T-Peak* vor der hellgelb unterlegten Kontrolle). Die analysierten Cytosine (bzw. C/T-Verhältnis) der fünf untersuchten CpG-Dinukleotide sind im Pyrogramm blau unterlegt. Der Methylierungsgrad des Cytosins vom ersten nicht methylierten CpG-Dinukleotid betrug 4%, des zweiten 12%, des dritten 1%, des vierten 3% und des letzten 10%. Zum Vergleich ist in der Abbildung 16C das Pyrogramm der Bisulfit-konvertierten, methylierten DNA-Kontrollprobe (Qiagen) dargestellt. Der Methylierungsgrad der methylierten Cytosine der fünf CpG-Dinukleotide betrug 70%, 76%, 64%, 73% und 75%. Die Pyrogramme in Abb. 16B und C dienten als Referenz für die nachfolgende Methylierungsanalyse der Patienten-DNA-Proben.

Ergebnisse

A) nicht Bisulfit-konvertierte DNA-Kontrollprobe:**B) Bisulfit-konvertierte, nicht methylierte DNA-Kontrollprobe:**

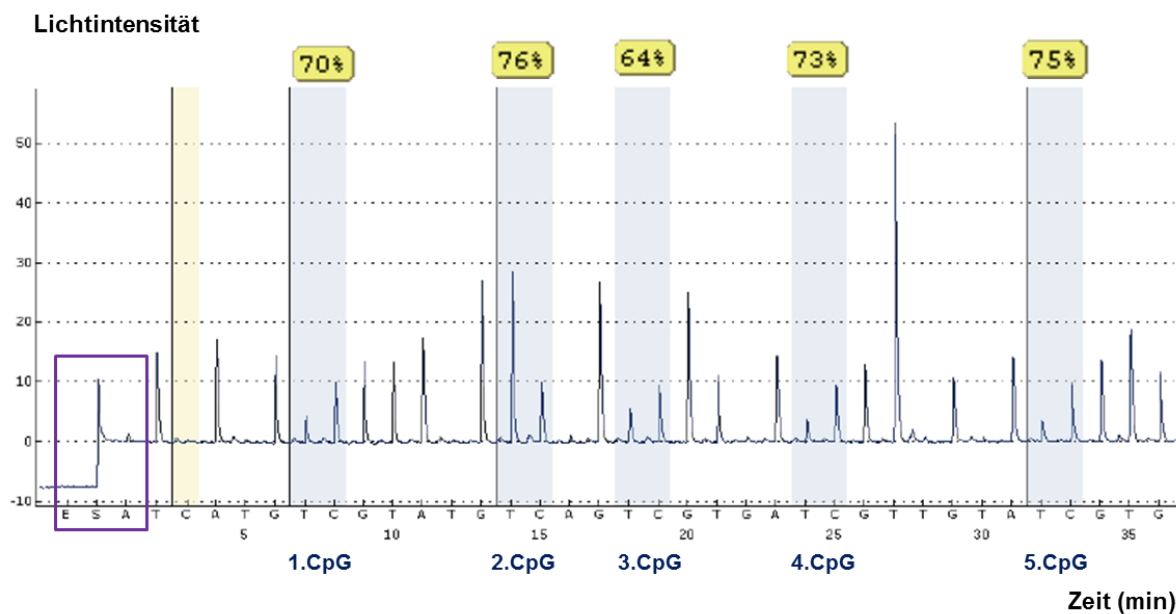
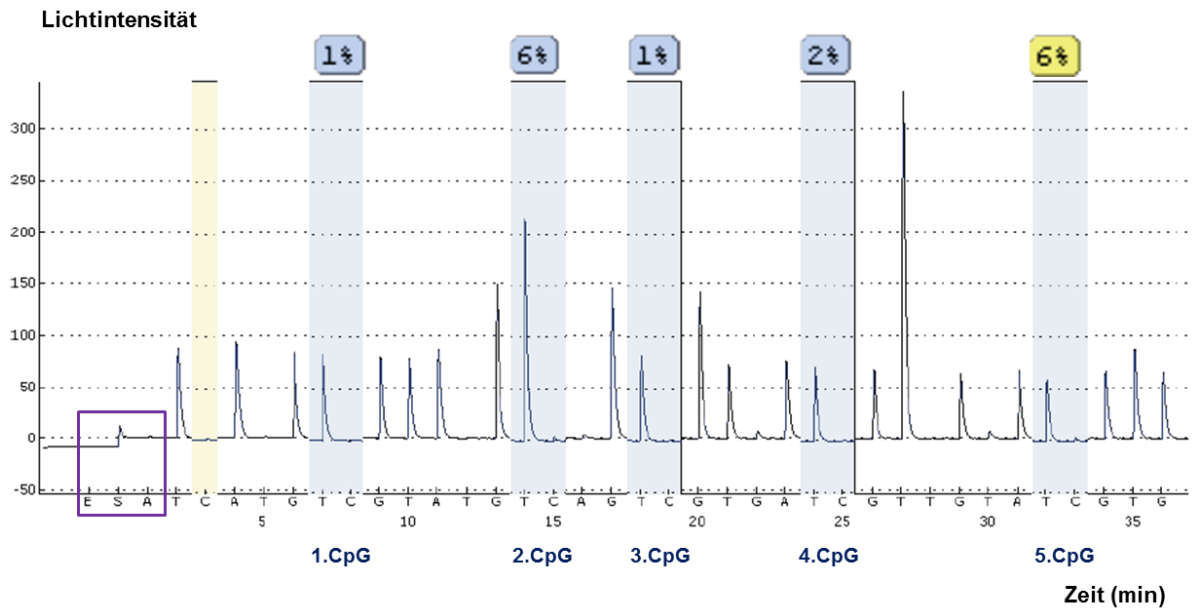
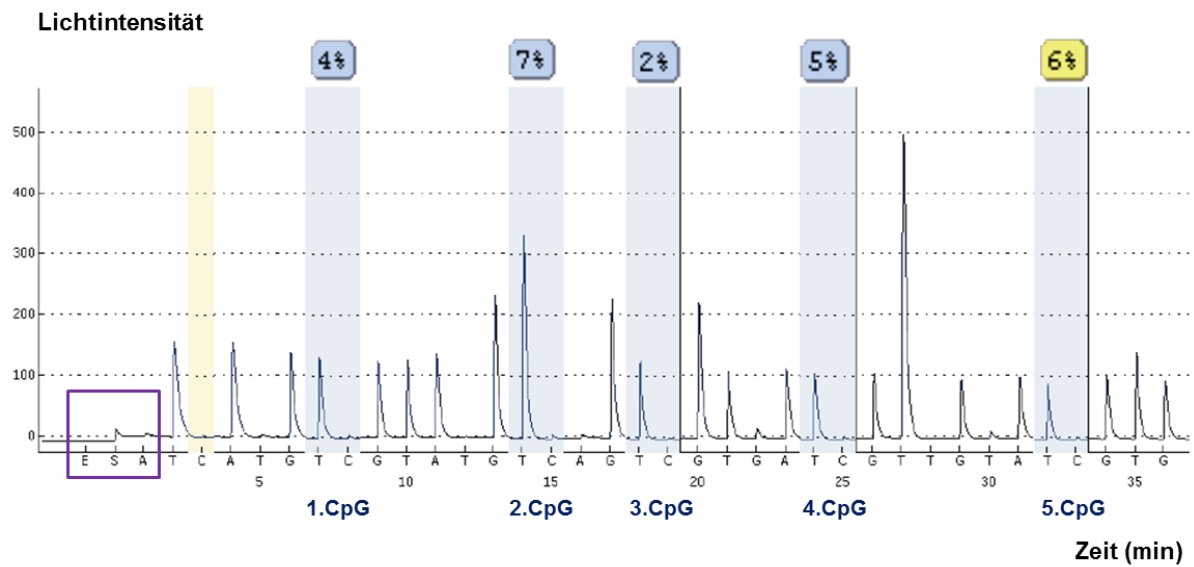
C) Bisulfit-konvertierte, methylierte DNA-Kontrollprobe:

Abb. 16: Pyrogramme der 3 DNA-Kontrollproben (Qiagen). **A)** nicht Bisulfit-konvertierte DNA-Kontrollprobe **B)** Bisulfit-konvertierte, nicht methylierte DNA-Kontrollprobe und **C)** Bisulfit-konvertierte, methylierte DNA-Kontrollprobe. Die X-Achse zeigt die Nukleotid-Abfolge der DNA-Sequenz und die Zeit in Minuten an. Die Y-Achse zeigt die relative Lichteinheit (Lichtintensität). Die Pyrosequenzierung erfolgte in 5'→3'-Richtung. Als interne Kontrollen für die Pyrosequenzierungsreaktion dienten die Negativ-Kontrolle: nur Enzym-Mix (E), Positiv-Kontrolle: Enzym-Mix mit dem Substrat (S) und als weitere Negativ-Kontrolle ein nicht zur Sequenzabfolge komplementäres Nukleotid (A) (violetter Kasten). Zur Beurteilung der erfolgreichen Bisulfit-Konvertierung der analysierten DNA-Sequenz wurde in dieser Sequenz die erste Cytosin-Base, der kein Guanin folgt, als interne Kontrolle (hellgelb unterlegt) ausgewählt. Die Cytosine (C/T) der fünf untersuchten CpG-Dinukleotide sind (blau unterlegt) hervorgehoben und das Methylierungs-Ergebnis in Prozent angegeben.

Im Folgenden sind beispielhaft die Pyrogramme der DNA-Proben des gesunden Probanden, N1 (Abb.17A), des HCV-Therapieversagers, Pat. 46 (Abb. 17B) und des HCV-Responders, Pat. 54 (Abb. 17C) dargestellt. Die interne Kontrolle (C) zeigte bei diesen Pyrogrammen je eine vollständige Bisulfit-Konvertierung. Das Pyrogramm der gesunden Probanden-Probe wies eine Cytosin-Methylierung von 1%, 6%, 1%, 2% und 6% auf. In der Probe von Pat. 46 konnte beobachtet werden, dass der Methylierungsgrad der Cytosine in den fünf untersuchten CpG-Dinukleotiden 4%, 7%, 2%, 5% und 6% betrug. Dieses Resultat ist mit der Probe des gesunden Probanden, N1 vergleichbar. Das Pyrogramm von Pat. 54 zeigte ein ähnliches Methylierungs-Ergebnis von 4%, 4%, 2%, 5% und 11%.

A) gesunder Proband: (N1)**B) Therapieversager: Pat. 46**

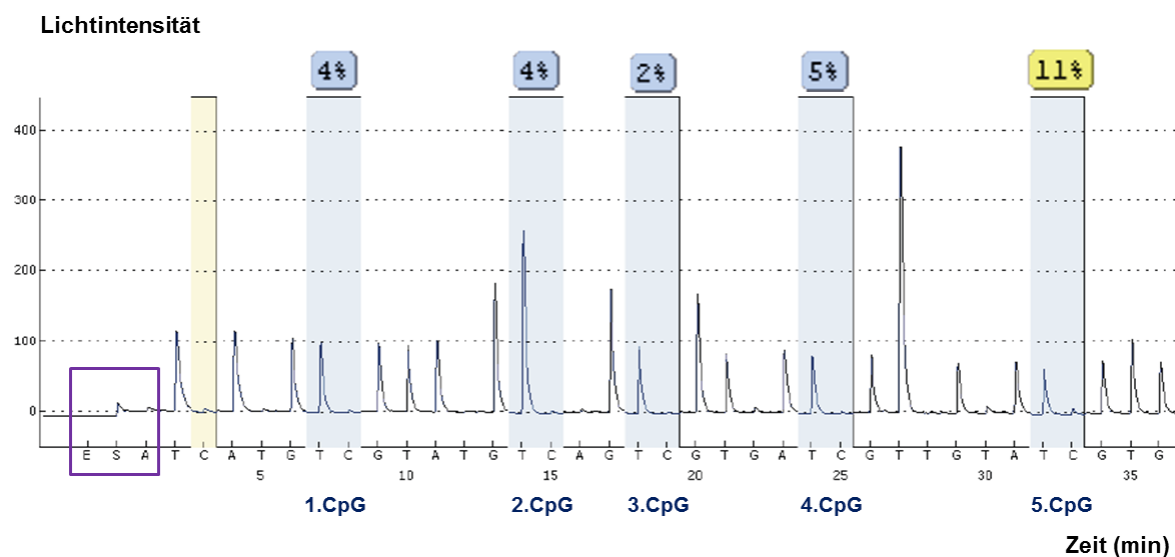
C) Responder: Pat. 54

Abb. 17: Pyrogramm der A) gesunden Probanden-Probe (N1), B) der Therapieversager-Probe (Pat. 46) und C) der Responder-Probe (Pat. 54). Die X-Achse zeigt die Nucleotid-Abfolge der DNA-Sequenz und die Zeit in Minuten an. Die Y-Achse zeigt die relative Lichteinheit (Lichtintensität). Die Pyrosequenzierung erfolgte in 5'→3'-Richtung. Als interne Kontrollen für die Pyrosequenzierungsreaktion dienten die Negativ-Kontrolle: nur Enzym-Mix (E), Positiv-Kontrolle: Enzym-Mix mit dem Substrat (S) und als weitere Negativ-Kontrolle ein nicht zur Sequenzabfolge komplementäres Nucleotid (A) (violetter Kasten). Zur Beurteilung der erfolgreichen Bisulfit-Konvertierung der analysierten DNA-Sequenz wurde in dieser Sequenz die erste Cytosin-Base, der kein Guanin folgt, als interne Kontrolle (hellgelb unterlegt) ausgewählt. Die Cytosine (C/T) der fünf untersuchten CpG-Dinukleotide sind (blau unterlegt) hervorgehoben und das Methylierungs-Ergebnis in Prozent angegeben.

III.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Methylierung im humanen *ISG15*-Promotor

Mit dem CpG-5'-alternativ-, CpG-3'-up- und dem CpG-3'-down-Test wurden insgesamt 14 CpG-Dinukleotide in der *ISG15*-Promotorregion analysiert. Die Methylierungs-Ergebnisse der zehn Proben des Norm-Kollektivs, sieben Responder-, neun Therapieversager- und neun Proben der therapienaiven HCV-Patienten sind in der Tabelle 26A-D dargestellt. Zusammengefasst zeigten alle Pyrogramme der drei CpG-Tests eine ähnlich geringe Cytosin-Methylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide, die zwischen 1-15% lag, mit Ausnahme einer Probe, die eine etwas höhere Cytosin-Methylierung aufwies. Bei der Probe des HCV-Patienten 148 (Therapieversager) wurde,

wenn man alle drei CpG-Tests zusammenfasst, eine Cytosin-Methylierung von 10-28% nachgewiesen, auf die später noch näher eingegangen wird.

Im Folgenden werden die Methylierungsergebnisse jedes dieser CpG-Tests ausführlicher beschrieben. Im CpG-5'-alternativ-Test zeigten die Pyrogramme der untersuchten Probanden- und HCV-Patienten-Proben eine niedrige Methylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide, die zwischen 1-12% lag. Diese CpG-Dinukleotide wiesen somit einen ähnlichen Methylierungsgrad wie die entsprechende nicht methylierte DNA-Kontrollproben von Qiagen auf. Nur bei der Probe, des HCV-Patienten 148 wurde ein höherer Methylierungsgrad, beim Cytosin des 1.CpG-Dinukleotids 24%, des 2. und 3.CpGs je 28% und des 4.CpGs von 10% nachgewiesen. Des Weiteren fiel auf, dass von den vier untersuchten CpG-Dinukleotiden des CpG-5'-alternativ-Tests bei der Mehrheit des Norm- und HCV-Patienten-Kollektivs das 4. CpG-Dinukleotid am höchsten methyliert war. Die höchste Methylierung in diesem Test wurde im 4.CpG-Dinukleotid der 5/10 Probanden, 5/7 Responder, 6/9 Therapieversager und 5/9 therapienaiven HCV-Patienten nachgewiesen. Mit dem CpG-3'-up-Test wurde im Norm und HCV-Kollektiv eine ähnlich geringe Cytosin-Methylierung von 1-15% der fünf untersuchten CpG-Dinukleotide nachgewiesen, mit Ausnahme der HCV-Patienten-Probe 148. Der Methylierungs-grad dieser Probe betrug beim Cytosin des ersten CpG-Dinukleotids 19%, des zweiten 17%, des dritten 18%, des vierten 21% und des letzten 17%, damit etwa doppelt so hoch wie bei den anderen Norm- und HCV-Patienten-Proben. Die höchste Cytosin-Methylierung (6-15%) wurde bei den meisten Proben dagegen im 5. CpG-Dinukleotid nachgewiesen: 9/10 der Probanden-, 5/7 der Responder-, 6/9 der Therapieversager- und 8/9 der therapienaiven HCV-Patienten-Proben. Die Methylierungsergebnisse des letzten Tests, CpG-3'-down lassen sich wie folgt zusammenfassen: Bei den fünf untersuchten CpG-Dinukleotiden wurde mit 1-9% ebenfalls eine niedrige Cytosin-Methylierung identifiziert, die leicht niedriger war als bei den anderen beiden Tests. Nur die Pat.148-Probe wies eine leicht erhöhte Cytosin-Methylierung von 12%, 15%, 16%, 10% und 10% auf. Die höchste Methylierung wurde bei 8/10 der Probanden, 7/7 der Responder, 6/9 der Therapieversager und bei 9/9 der therapienaiven HCV-Patienten im 5. CpG-Dinukleotid nachgewiesen.

Zusammengefasst zeigte die Untersuchung des kleinen Kollektivs, dass bei den getesteten Probanden- und HCV-Patienten-Proben der analysierte *ISG15*-Promotorabschnitt eine niedrige Cytosin-Methylierung aufwies und somit eher unmethyliert vorlag. Die einzige Patienten-Probe des gesamten HCV-Kollektivs, die eine etwas höhere Cytosin-Methylierung aufwies, war die des Pat.148. Da es sich bei dieser Probe nur um eine von insgesamt neun Therapieversager-Proben handelte, die eine höhere Cytosin-Methylierung zeigte, konnte anhand dieser Ergebnisse keine Aussage gemacht werden, ob eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Therapieansprechen besteht, weil die Anzahl der analysierten HCV-Patienten-Proben zu gering war.

Ergebnisse

Tab. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Methylierung im *ISG15*-Promotor. Ergebnisse der Cytosin-Methylierung des CpG 5'-alternativ-, CpG 3'-up- und CpG 3'-down-Tests im untersuchten A) Norm-, B) Responder- (SVR), C) Therapievorsager- und D) therapienaiven HCV-Patienten-Kollektiv.

A)

	CpG 5'-alternativ				CpG 3'-up					CpG 3'-down				
Norm (n=10):	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG
Probe A	2	1	6	3	3	3	2	3	8	4	2	5	4	6
Probe B	1	2	2	6	3	8	2	5	6	4	2	3	3	3
Probe D	2	4	2	6	6	7	4	6	11	7	4	3	5	6
Probe K	6	2	7	7	5	7	2	2	7	4	6	5	5	7
Probe N1	7	3	3	4	1	6	1	2	6	4	3	4	2	5
Probe N27	1	2	12	11	1	7	3	7	7	7	6	5	4	8
Probe N28	6	9	10	9	5	8	4	10	10	7	7	6	6	9
Probe N29	1	1	3	9	5	7	3	6	13	6	5	6	5	8
Probe N38	3	2	5	9	3	6	4	8	11	3	5	5	4	7
Probe N39	8	3	5	2	3	6	2	5	8	1	2	4	3	6

Alle Angaben der methylierten Cytosine von CpG-Dinukleotiden in Prozent %.

B)

	CpG 5'-alternativ				CpG 3'-up					CpG 3'-down				
SVR (n=7):	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG
Pat. 3	8	2	2	7	5	11	4	7	12	3	8	4	5	8
Pat. 37	3	9	5	7	3	8	2	3	6	3	5	4	2	5
Pat. 40	4	3	5	6	4	7	2	6	9	4	5	6	5	7
Pat. 43	5	4	6	7	5	11	4	8	10	4	5	5	5	7
Pat. 54	2	2	6	9	4	4	2	5	11	4	4	2	3	7
Pat. 58	3	4	5	6	4	7	3	6	9	3	4	4	3	5
Pat. 70	5	4	5	5	4	7	2	5	8	5	5	7	6	7

Alle Angaben der methylierten Cytosine von CpG-Dinukleotiden in Prozent %.

Ergebnisse

C)

Therapie- versager (n=9):	CpG 5'-alternativ				CpG 3'-up					CpG 3'-down				
	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG
Pat. 11	6	4	12	10	5	15	3	12	15	4	5	6	4	5
Pat. 16	3	10	5	10	4	8	3	5	9	7	4	6	4	7
Pat. 44	4	3	5	7	3	8	2	8	8	4	5	3	3	6
Pat. 46	5	4	3	6	4	7	2	5	6	4	4	4	3	6
Pat. 48	4	5	5	6	3	4	2	5	5	2	2	2	2	4
Pat. 56	3	2	2	5	2	10	1	9	9	7	6	4	5	6
Pat. 122	8	6	7	7	3	5	2	5	6	5	6	5	5	7
Pat. 148	24	28	28	10	19	17	18	21	17	12	15	16	10	10
Pat. 157	2	4	10	7	3	6	2	4	8	4	4	4	3	7

Alle Angaben der methylierten Cytosine von CpG-Dinukleotiden in Prozent %.

D)

Therapie- naive (n=9):	CpG 5'-alternativ				CpG 3'-up					CpG 3'-down				
	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG	1.CpG	2.CpG	3.CpG	4.CpG	5.CpG
Pat. 120	5	2	3	11	2	6	2	4	6	3	4	5	4	6
Pat. 123	4	5	6	10	2	7	3	5	8	3	5	3	4	7
Pat. 124	5	3	3	4	4	5	1	5	7	5	6	6	5	7
Pat. 127	3	3	6	5	6	13	5	7	10	7	8	4	5	9
Pat. 140	6	3	8	7	3	10	3	7	10	4	6	5	4	7
Pat. 142	2	4	6	7	3	6	2	6	12	3	4	4	2	6
Pat. 152	4	3	3	7	6	6	3	6	9	3	4	4	4	6
Pat. 153	5	3	9	8	3	6	4	7	9	4	5	3	4	6
Pat. 156	4	4	5	6	3	6	2	5	8	4	4	5	4	6

Alle Angaben der methylierten Cytosine von CpG-Dinukleotiden in Prozent %.

III.4 In vitro Untersuchung des Zusammenhanges zwischen ISG15 und miRNA-122 bei der HCV-Replikation

Das Hepatitis-C-Virus induziert in der Leber die Expression von Typ-I-Interferonen, die daraufhin die Hochregulation von interferon-stimulierten Genen (ISGs) wie z.B. ISG15 verursachen. Für ISG15 wurde im humanen und murinen Zellkultursystem eine stimulierende Rolle bei der HCV-Replikation nachgewiesen (Broering R. et al., 2010). Für die leberspezifische miRNA-122 wurde ebenso eine stimulierende Wirkung auf die Vermehrung des Virus beschrieben (Jopling C. et al, 2005; Henke et al, 2008). Im dritten Teil der Arbeit wurde deshalb die Fragestellung untersucht, ob eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Faktoren existiert.

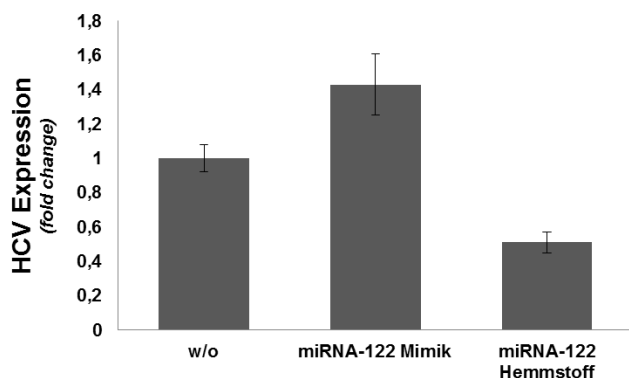
III.4.1 Einfluss von miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff auf die HCV-Replikation und ISG15-Genexpression in Con1-Zellen

Um den möglichen Zusammenhang zwischen miRNA-122 und ISG15 *in vitro* zu untersuchen, wurde das humane HCV-Replikonsystem Con1 verwendet. Um den Einfluss der Mimikry bzw. Hemmung von miRNA-122 auf die *ISG15*-Genexpression und die HCV-Replikation zu untersuchen, wurden die Con1-Zellen jeweils mit spezifischer miRNA-122 nachahmenden RNA (miRNA-122-Mimik) und spezifischer miRNA-122 inhibierenden ssRNA (miRNA-122-Hemmstoff) transfiziert. 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden die Con1-Zellen durch Zugabe von Qiazol geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Mit der quantitativen *real-time*-RT-PCR wurde anschließend die *ISG15*- und die HCV-Expression gemessen. Die Kopienzahlen von HCV und ISG15 wurden gegen die des Referenzgens, ACTB (beta-Aktin) normalisiert und gegen den Mittelwert der unbehandelten Probe abgeglichen.

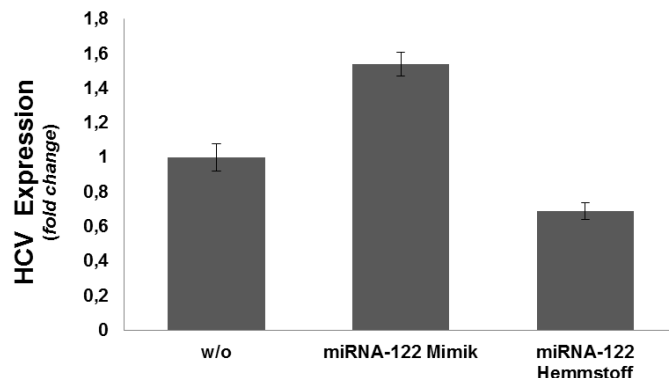
Die Abbildungen 18A und B zeigen die HCV-Replikation nach 48- und 72-stündiger Transfektion von Con1-Zellen mit miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff. Die mit miRNA-122-Mimik transfizierten Ansätze in Abb. 18A und B wiesen zu beiden Zeitpunkten eine höhere HCV-Expression auf als die entsprechenden unbehandelten Zellen. Bei beiden Zeitpunkten war die HCV-Expression in diesen Ansätzen ähnlich hoch. Die Erhöhung der HCV-Expression durch die miRNA-122-Mimik war nach 48 Stunden nicht signifikant (p-Wert=0,071), jedoch nach 72 Stunden (p-Wert=0,0005). Im Vergleich dazu zeigten die Con1-Zellen, die mit dem miRNA-122-Hemmstoff (Abb. 18A und B) transfiziert wurden, bei beiden Zeitpunkten eine signifikante Erniedrigung der HCV-Expression (nach 48h: p-Wert=0,0004; nach 72h: p-Wert=0,011). Allerdings war die HCV-Expression in diesen Ansätzen beim früheren Zeitpunkt (48h) etwas niedriger als nach 72h. Somit wies der miRNA122-Hemmstoff nach 48 Stunden Transfektion einen deutlicher inhibierenden und signifikanteren Effekt auf die HCV-Replikation auf als nach 72

Stunden. Zusammengefasst konnte anhand dieser Untersuchungen in den Con1-Zellen für die miRNA-122-Mimik ein stimulierender und für den miRNA-122-Hemmstoff ein hemmender Effekt auf die HCV-Replikation nachgewiesen werden.

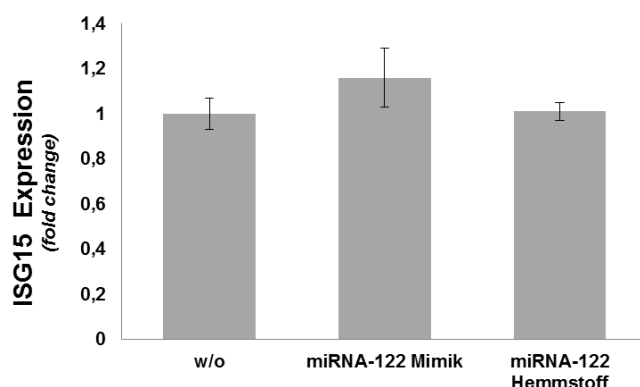
A) 48h



B) 72h



C) 48h



D) 72h

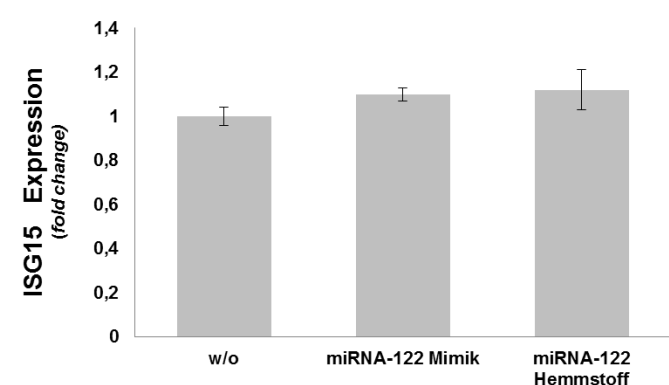


Abb. 18: Transfektion von humanen Con1-Zellen mit miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff

Con1-Zellen wurden mit miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff transfiziert. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und mit der quantitativen *real-time*-RT-PCR die HCV-Replikation A) nach 48h, B) nach 72h und die ISG15-Genexpression C) nach 48h, D) nach 72h bestimmt. Der Expressionsunterschied (*Fold change*) zwischen den unterschiedlich behandelten Proben wurde ermittelt, indem die Kopienzahlen von HCV/ISG15 gegen die von ACTB normalisiert und anschließend gegen den entsprechenden Mittelwert der unbehandelten Kontrolle abgeglichen wurde. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

In den gleichen Con1-Zellen wurde auch die *ISG15*-Genexpression untersucht, um zu überprüfen, ob eine Veränderung der miRNA-122 in den Zellen eventuell einen Effekt auf die *ISG15*-Genexpression hat. In den Abbildungen 18C und D ist die *ISG15*-Genexpression nach 48- und 72-stündiger Transfektion von Con1-Zellen mit miRNA-122-Mimik und miRNA-122-Hemmstoff zu sehen. Hier war keine signifikante Änderung der *ISG15*-Genexpression bei beiden Zeitpunkten nachzuweisen (w/o vs. miRNA-122-Mimik, (48h) p-Wert=0,32; (72h) p-Wert=0,063); w/o vs. miRNA-122-Hemmstoff, (48h) p-Wert=0,85; (72h) p-Wert=0,26). Weder die miRNA-122-Mimik noch der miRNA-122-Hemmstoff zeigten bei den untersuchten Zeitpunkten einen Effekt auf die *ISG15*-Expression.

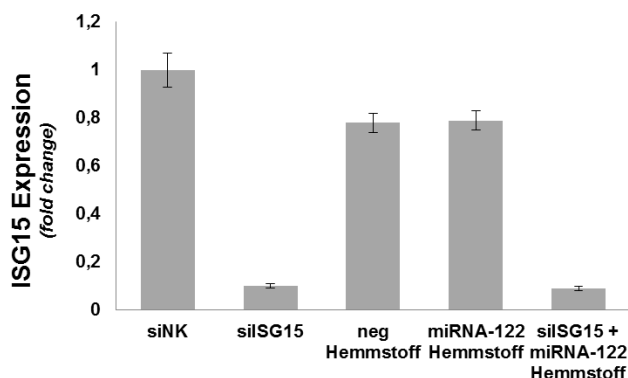
III.4.2 Kombinierte Suppression von *ISG15* und miRNA-122 und dessen Effekt auf die HCV-Replikation in Con1-Zellen

Da die Suppression von *ISG15* ebenso wie die Hemmung der miRNA-122 *in vitro* einen Rückgang der HCV-Replikation verursacht, wurde im Folgenden ein möglicher synergistischer Effekt durch Suppression von *ISG15* und miRNA-122 in Con1-Zellen untersucht. Dafür wurden die Con1-Zellen in fünf Ansätzen mit 1.) unspezifischer Kontroll-siRNA (siNK), 2.) spezifischer siRNA gegen die *ISG15*-Sequenz (si*ISG15*), 3.) unspezifischer inhibierender ssRNA (neg. Hemmstoff), 4.) spezifischer miRNA-122 inhibierenden ssRNA (miRNA-122-Hemmstoff) oder 5.) der Kombination aus si*ISG15* und miRNA-122-Hemmstoff transfiziert. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und anschließend mit *real-time-RT-PCR* die *ISG15*- und HCV-Expression bestimmt. Die Kopienzahlen von HCV und *ISG15* wurden jeweils mit dem Referenzgen ACTB (beta-Aktin) normalisiert und auf den Mittelwert der unspezifischen siRNA-Kontrolle bezogen.

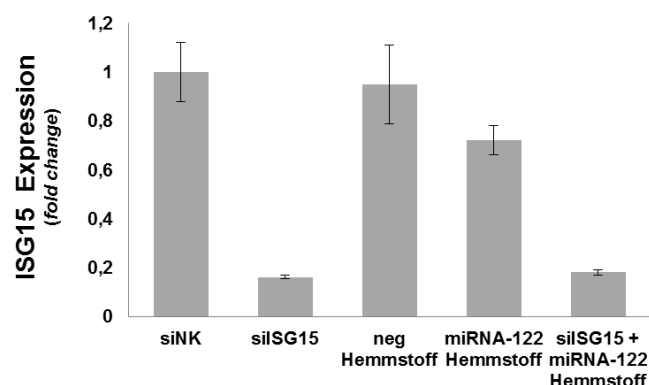
Die Abbildungen 19A und B zeigen die *ISG15*-Genexpression nach 48h und 72h Transfektion in den verschiedenen Transfektionsansätzen. Zusammengefasst ist in beiden Abbildungen zu sehen, dass in Con1-Zellen, die mit der spezifischen si*ISG15* transfiziert wurden, eine effiziente *ISG15*-Suppression erzielt wurde. Die Transfektion mit si*ISG15* führte im Vergleich zur Transfektion mit der unspezifischen siNK-Kontrolle, zu einer signifikanten Erniedrigung der *ISG15*-Expression (siNK vs. si*ISG15*, (48h) p-Wert=0,000002; (72h) p-Wert=0,0004). Interessanterweise war die *ISG15*-Inhibition durch si*ISG15* in den Con1-Zellen nach der 48-stündigen Transfektion mit einer *knock down*-Effizienz von ca. 90% etwas stärker als nach 72 Stunden mit ca. 80%. Demnach schien die Suppression von *ISG15* nach 72 Stunden wieder abzunehmen. Auch in Con1-Zellen, die im Doppelansatz gleichzeitig mit si*ISG15* und miRNA-122-Hemmstoff transfiziert wurden, wurde nach 48 und 72 Stunden eine vergleichbar effiziente *ISG15*-Suppression nachgewiesen wie in den Zellen, die nur mit si*ISG15* transfiziert wurden. Des Weiteren zeigte die Transfektion von Con1-

Zellen mit dem spezifischen miRNA-122-Hemmstoff in beiden Zeitpunkten (Abb. 19A und B) eine ähnlich hohe *ISG15*-Expression wie die dazugehörige unspezifische Hemmstoff-Kontrolle (neg. Hemmstoff) (48h) p -Wert=0,868; (72h) p -Wert=0,23), was erneut darauf hin deutet, dass die Inhibition von miRNA-122 keinen Einfluss auf die *ISG15*-Expression hatte.

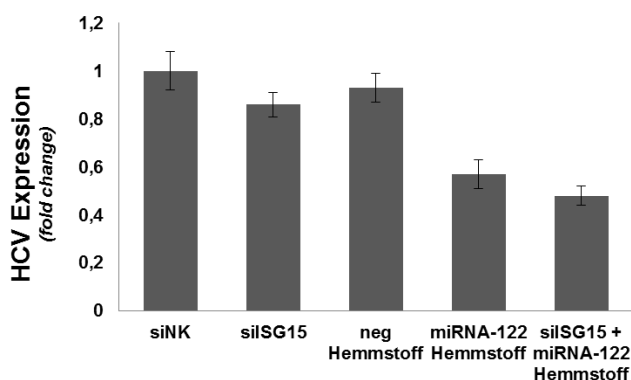
A) 48h



B) 72h



C) 48h



D) 72h

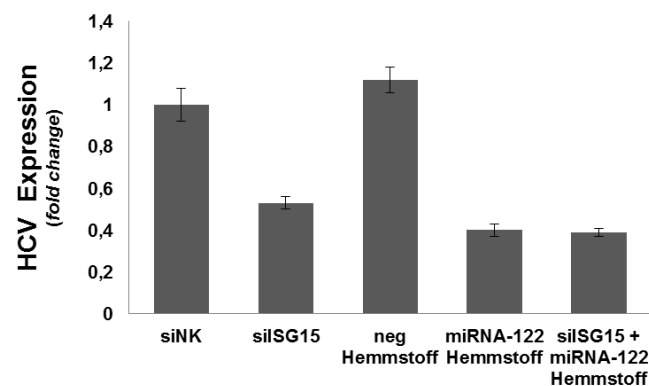


Abb. 19: Transfektion von humanen Con1-Zellen mit siNK, siISG15, neg. Hemmstoff, miRNA-122-Hemmstoff bzw. einer Kombination aus siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff.

48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Con1-Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Mittels quantitativen *real-time*-RT-PCR wurde anschließend *ISG15*-Genexpression A) (48h) und B) (72h) und die *HCV*-Expression C) (48h) und D) (72h) gemessen. Der Expressionsunterschied (*Fold change*) zwischen den unterschiedlich behandelten Proben wurde ermittelt, indem die Kopienzahlen von *HCV*/*ISG15* gegen die des Referenzgens *ACTB* normalisiert und anschließend gegen den entsprechenden Mittelwert der unspezifischen siRNA-Kontrolle abgeglichen wurde. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildungen 19C und D zeigen die HCV-Expression in den unterschiedlich behandelten Transfektionsansätzen. Die beiden Negativ-Kontrollen, siNK und der inhibierende negative Hemmstoff zeigten nach 48 und 72 Stunden keinen Effekt auf die HCV-Expression. Auch die Transfektion mit siISG15 zeigte nach 48 Stunden keine signifikante Änderung der HCV-Expression im Vergleich zur siNK-Kontrolle (p-Wert=0,1943, Abb. 19C). Interessanterweise war erst nach 72 Stunden beim Transfektionsansatz mit siISG15 ein signifikanter inhibierender Effekt auf die HCV-Expression nachweisbar (p-Wert=0,0005, Abb. 19D). Auch war in Con1-Zellen, die mit dem miRNA-122-Hemmstoff behandelt wurden, eine inhibierende Wirkung auf die HCV-Expression erkennbar. Dieser Effekt war zu beiden Zeitpunkten sichtbar, wobei die inhibierende Wirkung erst nach 72 Stunden signifikanter war (neg. Hemmstoff vs. miRNA-122-Hemmstoff, (48h) p-Wert=0,0008; (72h) p-Wert=0,0000003). Unter Einfluss des miRNA-122-Hemmstoffs war im Gegensatz zum Ansatz mit siISG15 nach 72 Stunden eine etwas stärkere signifikante HCV-Suppression zu sehen (p-Wert=0,015). Interessanterweise zeigte der Doppelansatz, der gleichzeitig mit siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff transfiziert wurde, an beiden Zeitpunkten einen mit dem miRNA-122-Hemmstoff vergleichbaren inhibierenden Effekt auf die HCV-Expression ((48h) p-Wert=0,271; (72h) p-Wert=0,720, Abb. 19C und D). Die Hemmung der HCV-Expression war im Doppelansatz im Vergleich zu der Suppression mit siISG15 allein etwas stärker (siISG15 vs. siISG15+miRNA-122-Hemmstoff, (48h) p-Wert=0,000075; (72h) p-Wert=0,0019). Zusammenfassend wurde die Inhibition der HCV-Expression in den Doppelansätzen zu beiden Zeitpunkten nicht durch eine Kombination aus siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff verstärkt. Diese Daten deuten darauf hin, dass durch die kombinierte Transfektion von siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff kein synergistischer, inhibierender Effekt auf die HCV-Vermehrung besteht. ISG15 und miRNA-122 haben höchstwahrscheinlich einen voneinander unabhängigen hemmenden Effekt auf die HCV-Replikation.

IV Diskussion:

IV.1 Genotypisierung von SNPs in der Norm- und HCV-Patienten-Kohorte

Die Daten von Asselah et al. und Chen et al. zeigten, dass Responder- und Non-Responder HCV-Patienten vor einer IFN-basierten antiviralen Therapie unterschiedliche Genexpressionsprofile aufweisen (Chen L. et al., 2005; Asselah T. et al., 2008). In Non-Respondern wurde im Vergleich zu Respondern eine höhere hepatische Genexpression von verschiedenen *ISGs*, insbesondere von *ISG15*, nachgewiesen (Chen L. et al., 2005; Asselah T. et al., 2008). Weil die zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismen für die unterschiedliche Genexpression von *ISG15* bei Respondern und Therapieversagern unbekannt sind, ist die Untersuchung von genetischen Unterschieden in Form von SNPs relevant und von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurde von den zwölf untersuchten SNPs bei neun SNPs kein genetischer Polymorphismus in der Norm- und HCV-Patienten-Kohorte nachgewiesen. Bei diesen SNPs wurde in allen 31 DNA-Proben jeweils nur der homozygote Genotyp gefunden (Tab. 20 und 21). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass hier nur eine kleine Probenanzahl analysiert wurde und es nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein seltener Polymorphismus erst bei einer größeren Patientenanzahl erkennbar ist. In den übrigen drei der zwölf SNPs wurde ein genetischer Polymorphismus identifiziert. Der Polymorphismus wurde nur in drei HCV-Patienten in Form des heterozygoten Genotyps bei SNP rs2341365 (A/G), bei rs4615788 (C/G) und bei SNP rs60637872 (CAA/---) nachgewiesen (Tab. 20-22). Zur Interpretation des Auftretens der Heterozygotie wurde die Ethnizität dieser HCV-Patienten überprüft. Bei den drei HCV-Patienten handelte es sich um Europäer, die zur kaukasischen, ethnischen Bevölkerungsgruppe gehören. Damit konnte die Ethnizität als Grund für das Auftreten der Heterozygotie bei diesen HCV-Patienten ausgeschlossen werden. Des Weiteren handelte es sich bei den drei HCV-Patienten, um den HCV-Patienten 3, einen Responder und die HCV-Patienten 11 und 16, die beide Therapieversager waren. Daraus ergibt sich, dass der heterozygote Genotyp bei allen drei SNPs tendenziell etwas häufiger bei den Therapieversagern auftritt als bei Respondern. Allerdings fehlt dafür die statistische Sicherheit.

In der Literatur wurden in den letzten Jahren viele prädiktive Wirtsfaktoren in Form von SNPs beschrieben, die mit Therapie-Ansprechen bei chronischen HCV-Patienten assoziiert sind. Dabei handelt es sich um Polymorphismen in nicht-kodierenden und kodierenden DNA-Sequenzbereichen von Molekülen, die u.a. in Signaltransduktionswegen des angeborenen Immunsystems eine bedeutende Rolle spielen. Das angeborene Immunsystem (*innate immune system*) spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen mit hepatotropen Viren (Fearon D.T., Locksley R.M., 1996). Dazu zählen das *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-System, die Interferone

und die von Ihnen induzierten ISGs (Medzhitov R., 2001; McClary H. et al., 2000). Die bedeutendsten Polymorphismen, die in Korrelation mit Therapie-Ansprechen in HCV-Patienten von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen wurden, sind die beiden SNPs, rs12979860 (C/T) und rs8099917 (T/G) in der nicht-kodierenden Region des *IFNL3*-Genclusters (frühere Bezeichnung *IL28b*) (Abe H. et al., 2011, Ge D. et al., 2009; Suppiah V. et al., 2009; Tanaka Y. et al., 2009). Dabei handelt es sich um ein Genprodukt der IFN- λ -Familie, einem Typ-III-Interferon, das die Hochregulierung der *ISG*-Transkription bewirkt ähnlich wie IFN- α und - β , allerdings über einen anderen Rezeptor (Balagopal A. et al., 2010; Schoggins J.W., Rice C.M., 2011). Es wurde nachgewiesen, dass HCV-Patienten, die Träger des homozygoten Genotyps T/T in SNP rs8099917 und C/C in SNP rs12979860 sind, am wahrscheinlichsten ein Therapie-Ansprechen mit IFN- α und Ribavirin erreichen (Abe H. et al., 2011, Ge D. et al., 2009; Suppiah V. et al., 2009; Tanaka Y. et al., 2009). Suppiah et al. und Tanaka et al. berichteten außerdem, dass in peripheren Leukozyten von HCV-Patienten mit dem homozygoten Genotyp, der bei beiden SNPs mit Therapie-Ansprechen korreliert, die *IFNL3*-mRNA-Expression erhöht war (Suppiah V. et al., 2009; Tanaka Y. et al., 2009). Die Autoren vermuteten, dass die höheren *IFNL3*-mRNA-Level kombiniert mit IFN- α und Ribavirin ein besseres Therapie-Ansprechen bei diesen HCV-Patienten verursachen könnten. Allerdings sind derzeit die Mechanismen noch ungeklärt, welche die Assoziation zwischen diesen SNPs und der HCV-Hemmung vermitteln und wie diese SNPs die IFN-Signaltransduktionswege beeinflussen (Balagopal A. et al., 2010). Möglicherweise modulieren diese SNPs die *IFNL3*-Transkription, aber wahrscheinlicher ist es, dass sie gemeinsam mit einem oder mehreren SNPs in der kodierenden Region oder im Promotor des *IFNL3*-Gens auftreten (Balagopal A. et al., 2010).

Eine andere Arbeitsgruppe fand im TLR3-Rezeptor einen genetischen Polymorphismus. TLR3 ist ein pathogen erkennender Rezeptor des TLR-Systems, der virale dsRNA erkennt, was anschließend die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und dessen Translokation in den Nukleus zur Folge hat. Das resultiert in der Produktion von Typ-I-Interferonen und einer erhöhten *ISG*-Expression. Medhi et al. identifizierten einen neuen SNP (Allel -705) in der Promotorregion des *TLR3*-Gens (Medhi S. et al., 2011). Für diesen Polymorphismus wurde von den Autoren eine Prädisposition für die HCV-Infektion in den untersuchten HCV-Patienten vermutet (Medhi S. et al., 2011). Auf diesen Polymorphismus wird im Folgenden noch näher eingegangen. Des Weiteren fanden Hijikata et al. und Suzuki et al. in der Promotorregion des *MxA*-Gens (*myxovirus resistance A*) einen SNP (G/T in Position -88), der mit dem Ansprechen von HCV-Patienten auf die IFN-Therapie korrelierte (Hijikata M. et al., 2000; Suzuki F. et al., 2004). Beim MxA-Protein handelt es sich, um eine GTPase, die direkt an der Hemmung der HCV-Vermehrung beteiligt ist (Schoggins J.W., Rice C.M., 2011), weil es Viruspartikel inaktiviert, indem es diese Partikel oder andere virale Komponenten bindet (Sadler A.J., Williams B.R.G., 2008). Diejenigen HCV-Patienten, bei denen

der homozygote (T/T) oder heterozygote Genotyp (G/T) nachgewiesen wurde, zeigten mit höherer statistischer Wahrscheinlichkeit ein anhaltendes virologisches Ansprechen auf die HCV-Therapie gegenüber HCV-Patienten, die homozygot (G/G) waren (Suzuki F. et al., 2004). Die Autoren vermuteten, dass dieser Polymorphismus die *MxA*-Genexpression beeinflussen könnte, indem bei HCV-Patienten mit dem Genotyp T/T und G/T die Expression der *MxA*-mRNA effizienter sein könnte (Suzuki F. et al., 2004). Zuvor zeigten bereits die Daten von Antonelli et al. und Fernández et al., dass die *MxA*-mRNA- und -Protein-Level in PBMCs von Respondern signifikant höher waren als in Non-Respondern (Antonelli G. et al., 1999; Fernández M. et al., 1999). Deshalb vermuteten Hijikata et al. und Suzuki et al., dass Träger des Genotyps (T/T) oder (G/T) aufgrund der höheren *MxA*-Protein-Level effizienter auf HCV-Therapie ansprechen würden (Hijikata M. et al., 2000; Suzuki F. et al., 2004).

Im Gegensatz dazu sind bisher keine Daten über SNPs in der Promotorregion oder in der kodierenden DNA-Sequenz des *ISG15*-Gens publiziert, obwohl bereits vor einigen Jahren gezeigt wurde, dass Non-Responder im Vergleich zu Respondern eine höhere, hepatische *ISG15*-Genexpression vor Therapiebeginn haben (Chen L. et al., 2005). Die eigenen Ergebnisse liefern daher erste Hinweise zu diesem Thema.

Interessanterweise wurde die Heterozygotie in den eigenen Daten außerdem in allen drei SNPs in keiner DNA-Probe des Norm-Kollektivs identifiziert. Demzufolge schien der Polymorphismus häufiger im HCV-Kollektiv als im Norm-Kollektiv aufzutreten. Medhi et al. beobachteten bei dem SNP im *TLR3*-Promotor ein ähnliches Vorkommen im HCV-Patienten-Kollektiv, das eventuell zum Vergleich herangezogen werden kann (Medhi S. et al., 2011). In der Assoziationsstudie wurde mittels Sequenzierung das Vorkommen dieses SNPs zwischen HCV-Patienten und gesunden Probanden einer indischen Population untersucht. Bei Individuen mit Genotyp G wurde ein höheres Risiko beziehungsweise eine Prädisposition für eine Infektion mit HCV assoziiert (Medhi S. et al., 2011). Da der Polymorphismus in der räumlichen Nähe zur regulatorischen Promotorregion lokalisiert ist, wurde von den Autoren postuliert, dass dieser Polymorphismus die Promotoraktivität des *TLR3*-Gens modulieren oder beeinflussen könnte. Allerdings wurde keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und Expression der *TLR3*-mRNA in PBMCs gefunden (Medhi S. et al., 2011). Medhi et al. beschrieben eine Assoziation, die analog zu den eigenen Daten sein könnte. Denn die eigenen Untersuchungen zeigten, dass der gefundene Polymorphismus im *ISG15*-Promotor auch häufiger in HCV-Patienten als in Probanden vorkommt. Die eigenen Daten stehen zur Hypothese der Prädisposition nicht im Widerspruch.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die drei SNPs genetisch gekoppelt sind, weil der heterozygote Polymorphismus des SNPs rs4615788 stets mit den heterozygoten Genotypen der SNPs, rs2341365 und rs60637872 zusammen auftrat. Das deutet auf ein Phänomen hin, dass in der

Genetik als Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*) bezeichnet wird. Darunter versteht man „Einzelnukleotid-Varianten beziehungsweise Allele von Genen, die abhängig voneinander auftreten können, wenn sie in enger räumlichen Nähe auf einem Chromosom beieinander liegen“ (Freudenberg J. et al, 2002). Kopplungsungleichgewichte entstanden der Definition nach, wenn neue DNA-Varianten auf einem Chromosom auftraten und noch nicht genug Zeit vergangen ist, um durch meiotische Rekombination (*Cross-over*) voneinander getrennt zu werden und eine zufällige Verteilung in der Population zu erreichen (Freudenberg J. et al, 2002). Größte genetische Variabilität findet sich in der afrikanischen Population im Vergleich zu der geringer ausgeprägten Variabilität in den entwicklungsgeschichtlich jüngeren Populationen von Europäern und Asiaten (Freudenberg J. et al, 2002). Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei heterozygoten Genotypen im Kopplungsungleichgewicht stehen. Dafür spricht auch, dass diese drei SNPs sich innerhalb der humanen *ISG15*-Promotorsequenz gemäß den Angaben der NCBI-Datenbank in unmittelbarer räumlicher Nähe auf dem Chromosom 1 befinden mit einem Abstand von ca. 500 bp.

Ein Beispiel für ein Kopplungsungleichgewicht wurde in der Literatur von mehreren Arbeitsgruppen für das Chromosom 19 beschrieben. Diese DNA-Region, die mit einem HCV-Therapieansprechen assoziiert ist, enthält multiple SNPs im Kopplungsungleichgewicht (Balagopal A. et al., 2010; Rauch A. et al., 2010; Urban T.J. et al., 2010). Dazu zählen die beiden SNPs, rs12979860 und rs8099917 im *IFNL3*-Locus (frühere Bezeichnung *IL28b*), für die ein starkes Kopplungsungleichgewicht beschrieben wurde (Abe H. et al., 2011; Balagopal A. et al., 2010; Rauch A. et al., 2010). Außerdem fanden Ge et al., dass der SNP rs12979860 mit weiteren SNPs im starken Kopplungsungleichgewicht steht, dem nicht-synonymen SNP rs8103142 innerhalb der *IFNL3*-Gensequenz (Lysin → Arginin Substitution) und dem SNP rs28416813 (G → C Substitution), der in unmittelbarer Nähe zur Translationsinitiierungsstelle liegt (Ge D. et al., 2009).

Als weitere Auffälligkeit war erkennbar, dass bei allen drei SNPs von den möglichen drei Genotypen bzw. Allelkombinationen jeweils nur zwei nachgewiesen wurden. Das deutet entweder auf eine geringe Variabilität dieser SNPs hin oder darauf, dass im Fall dieser SNPs der dritten Genotyp-Variante ein negativer Selektionsdruck entgegensteht (Cichon S. et al., 2002). Allerdings kann aufgrund der kleinen Probenanzahl das Vorhandensein der geringen Variabilität nur vermutet werden und deren physiologische Bedeutung aus den bisherigen Ergebnissen nicht erschlossen werden.

In der NCBI-Datenbank ist für diese drei SNPs nach derzeitigem Kenntnisstand (letzter Zugriff 06.11.2015) keine klinische Relevanz beschrieben. Allerdings deuten die eigenen Ergebnisse auf eine mögliche Rolle in der Prädisposition für die HCV-Erkrankung hin. Es stellt sich die Frage, welche Auswirkung bzw. biologische Bedeutung diese Polymorphismen haben könnten. Da zwei

der drei SNPs, rs2341365 und rs4615788, sich in der Nähe der TATA-Box und des Start-Methionins des *ISG15*-Promotors befinden, kann eine Beeinflussung der *ISG15*-Transkription durch Modifikation einer Transkriptionsfaktorbindestelle oder einer anderen regulatorischen Promotorsequenz vermutet werden. Um das zu prüfen, müsste in zukünftigen Untersuchungen die *ISG15*-Genexpression in HCV-Patienten im Hinblick auf die Assoziation mit diesen Polymorphismen analysiert werden, um zu klären, ob sich dieser Polymorphismus auf Transkriptionsebene des *ISG15*-Gens auswirkt. Allerdings ist es auch möglich, dass diese SNPs im Kopplungsungleichgewicht mit einem oder mehreren SNPs stehen, die sich in der kodierenden DNA-Region des *ISG15*-Gens befinden, ähnlich wie im Fall der zuvor beschriebenen SNPs von *IFNL3* vermutet wird. Eine Untersuchung von SNPs in der kodierenden DNA-Region des *ISG15*-Gens könnte diese Vermutung bestätigen.

Die Existenz des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den drei SNPs wurde ausgenutzt, um die Untersuchung stellvertretend nur eines Polymorphismus auf eine größere Kohorte von gesunden Probanden und HCV-Patienten auszuweiten. Der SNP rs60637872 wurde als repräsentativer SNP ausgewählt. Zusammengefasst ergaben die Daten aus der kleinen und großen Kohorte eine um das mehr als fünffache erhöhte Häufigkeit der Heterozygotie in der HCV-Patienten-Kohorte (12,2%) im Vergleich zur Norm-Kohorte (2,4%) (Tab. 24). Es zeigte und bestätigte sich ein Trend mit dem häufigeren Vorkommen der Heterozygotie im HCV-Kollektiv. Allerdings ist zu beachten, dass hier fast dreimal so viele HCV-Patienten- wie Probanden-Proben analysiert wurden. Die geringe Anzahl an Probanden-Proben schwächt etwas die Aussagekraft (*Power*) dieser Untersuchung. Denn es muss berücksichtigt werden, dass in solchen genetischen Studien als Kontrolle idealerweise dreimal so viele Norm- wie Patienten-Proben analysiert werden sollten, um Aussagen mit ausreichender statistischer Sicherheit treffen zu können. Allerdings ist die Akquisition von Proben gesunder Probanden mit passender Altersverteilung in der klinischen Praxis schwieriger als von Patienten-Proben. Es gäbe die Möglichkeit für zukünftige genetische Studien eine größere Anzahl von Probanden-Proben aus der Nixdorf-Recall-Studie des Universitätsklinikums Essen nach Antragstellung zu bekommen. Das sollte unbedingt für zukünftige Studien berücksichtigt werden und erfolgen.

Diese Daten lieferten weitere neue Erkenntnisse, denn die Heterozygotie korrelierte tendenziell mit dem Nicht-Ansprechen auf die IFN-Therapie und ihrem Vorkommen in HCV-Patienten mit verschiedenen viralen Genotypen. Der heterozygote Genotyp (CAA/--) kam fast doppelt so häufig in Non-Respondern (19,4%) vor, denjenigen HCV-Patienten, die kein Ansprechen auf die antivirale IFN-basierte Therapie gezeigt haben im Vergleich zu Therapie-Respondern (9,2%), Relapsen (6,9%) oder HCV-Patienten mit einem virologischem Durchbruch unter Therapie (12,5%) (Tab. 24). Obwohl die Anzahl der HCV-Patienten in diesen Gruppen unterschiedlich umfangreich war, ist aus eigener Sicht eine Tendenz in Bezug auf eine Korrelation zwischen der

Heterozygotie und dem Therapie-Nicht-Ansprechen erkennbar. Des Weiteren kam der heterozygote Genotyp (CAA/---) am häufigsten in infizierten HCV-Patienten mit GT4 (25%) und am seltensten in HCV-Patienten mit GT3 (3,8%) vor (Tab. 25). Bei GT4 handelt es sich ähnlich wie bei GT1, um einen schwer therapierbaren Genotypen. HCV-Patienten mit GT4 zeigen in der Regel ein geringes Therapie-Ansprechen auf die duale Therapie mit IFN- α und Ribavirin (Nguyen M.H., Keeffre E.B., 2005). Weltweit variiert die Prävalenz der HCV-Infektion mit den verschiedenen Genotypen ziemlich stark zwischen den Ländern (Zipprich A., Dollinger M., 2010). HCV-Infektionen mit GT4 treten überwiegend in afrikanischen Ländern wie Ägypten, Sub-Sahara, Sudan, Kenia, dem Kongo oder in Saudi-Arabien auf (Nguyen M.H., Keeffre E.B., 2005; Zipprich A., Dollinger M., 2010). In Ägypten sind 90-91% aller HCV-Infektionen auf diesen Genotypen zurückzuführen (Antaki N. et al., 2009; Nguyen M.H., Keeffre E. B., 2005; Zipprich A., Dollinger M., 2010). Bei GT3 handelt es sich zusammen mit GT1 und GT2, um ubiquitär vorkommende Genotypen, die überwiegend in westlichen Industrieländern wie Nordamerika und Europa verbreitet sind (Antaki N. et al., 2010; Zipprich A., Dollinger M., 2010). In Deutschland wird die HCV-Infektion hauptsächlich durch GT1, GT2 und GT3 verursacht, allerdings wird durch die zunehmende Immigration von Personen aus den betroffenen Ländern die Verbreitung der HCV-Genotypen 4-6 in Deutschland größer (Zipprich A., Dollinger M., 2010). GT5 ist der vorwiegende HCV-Genotyp in Südafrika und GT6 in Südostasien (Smuts H.E, Kannemeyer J., 1995; Nguyen M.H., Keeffre E.B., 2005; Verbeeck J. et al., 2006; Zipprich A., Dollinger M., 2010). In der Literatur existieren zum Zusammenhang zwischen Polymorphismen und Patienten mit verschiedenen HCV-Genotypen-Infektionen aktuell sehr wenige Daten.

Zusammengefasst stellt sich die Frage, welchen Vorteil das Hepatitis-C-Virus von diesem Polymorphismus (Heterozygotie) in den HCV-Patienten haben könnte. Die eigenen Daten zeigten, dass der heterozygote Genotyp (CAA/---) etwas häufiger im HCV-Kollektiv und zwar tendenziell häufiger in Non-Respondern vorkommt. Asselah et al. und Chen et al. identifizierten eine Hochregulation der hepatischen *ISG15*-Genexpression in Non-Respondern, die mit dem Nicht-Ansprechen auf die duale Therapie assoziiert war (Asselah T. et al., 2008; Chen L. et al., 2005). Es kann vermutet werden, dass die Heterozygotie möglicherweise die Promotoraktivität des *ISG15*-Gens beeinflussen und eventuell eine höhere *ISG15*-Transkription verursachen könnte. Des Weiteren zeigten Broering et al. und Chen et al., dass die *ISG15*-Überexpression *in vitro* zur einer deutlich gesteigerten HCV-Vermehrung führte (Broering R. et al., 2010; Chen L. et al., 2010b). Broering et al. vermuteten, dass *ISG15* ein möglicher Mediator des Nicht-Ansprechens auf die duale Therapie in der HCV-Infektion sein könnte (Broering R. et al., 2010). Demzufolge würde das Hepatitis-C-Virus einen Nutzen von der höheren *ISG15*-Genexpression für seine Replikation haben. Diese Hypothese könnte möglicherweise die Korrelation zwischen der Heterozygotie und

ihrer häufigeren Verteilung im HCV-Kollektiv erklären, insbesondere in HCV-Patienten, die kein Therapie-Ansprechen zeigen.

IV.2 Analyse der DNA-Methylierung im humanen *ISG15*-Promotor von HCV-Patienten

Eine DNA-Methylierung der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich kann die Transkription des nachfolgenden Gens regulieren und zwar eine Inaktivierung der Genexpression bewirken (Feinberg A., 2001; Zhu J., 2006). Unter Berücksichtigung der publizierten Daten von Asselah T. et al. und Chen L. et al., dass Non-Responder HCV-Patienten im Vergleich zu Respondern vor Therapiebeginn eine höhere Genexpression von *ISG15* aufweisen, wurde in dieser Arbeit retrospektiv in beiden Gruppen von HCV-Patienten vor Therapiebeginn der Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im *ISG15*-Promotor als möglicher Regulationsmechanismus für die unterschiedliche *ISG15*-Genexpression untersucht (Asselah T. et al., 2008; Chen L. et al., 2005). Bisher sind über den Zusammenhang zwischen der *ISG15*-Promotor-Methylierung und dem Therapie-Ansprechen von HCV-Patienten keine Daten publiziert worden, daher liefern die eigenen Untersuchungen erste Hinweise zu diesem Thema. So zeigten die Pyrogramme der gesunden Probanden, Responder, Therapieversager und therapienaiven HCV-Patienten in den drei untersuchten Abschnitten des *ISG15*-Promotors (CpG-5'-alternativ-, CpG-3'-up- und CpG-3'-down-Test) einheitlich eine geringe Cytosin-Methylierung von zusammengefasst 1-15% (Tab. 26A-D), ähnlich wie die nicht methylierten DNA-Kontrollproben von Qiagen. Das deutet darauf hin, dass sowohl in der Probanden- als auch in der HCV-Patienten-Kohorte die Cytosine der CpG-Dinukleotide eher unmethyliert vorlagen. Es kann vermutet werden, dass in diesen Proben der *ISG15*-Promotor aufgrund der unmethylierten CpG-Dinukleotide transkriptionell potentiell aktiv bzw. nicht durch Methylierung inhibiert ist. Eine Transkription muss dennoch erst durch Aktivierung bzw. Zustandekommen eines Transkriptionskomplexes induziert werden. Interessanterweise wies eine einzige Probe des HCV-Patienten 148, einem Therapieversager, eine höhere Cytosin-Methylierung auf. In dieser Probe wurde in den CpG-Dinukleotiden zusammengefasst ein Methylierungsgrad von 10-28% nachgewiesen (Tab. 26A-D). Verglichen mit den anderen Proben war der Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide des Patienten 148 fast doppelt so hoch. Bei diesem HCV-Patienten deutet das auf eine höhere Cytosin-Methylierung im *ISG15*-Promotor hin, der somit möglicherweise in seiner transkriptionellen Aktivität eingeschränkt ist. Allerdings lässt die höhere DNA-Methylierung einer einzigen Therapieversager-Probe noch keine Rückschlüsse zu auf einen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen oder einen potentiellen Regulationsmechanismus für die unterschiedliche *ISG15*-Genexpression. Dafür müsste

in zukünftigen Untersuchungen eine größere Kohorte an HCV-Patienten, Non-Respondern und Respondern analysiert werden.

Es gibt nur sehr wenige Publikationen zum Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Therapie-Ansprechen in chronischen HCV-Patienten. Tseng K-C. et al. wiesen eine Korrelation zwischen der Methylierung des *SOCS1*-Promotors und dem Therapie-Ansprechen (auf pegIFN- α und Ribavirin) in chronischen HCV-Patienten nach (Tseng K-C. et al., 2013). Das intrazelluläre Protein SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling-1*) spielt als negativer Regulator des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges eine bedeutende Rolle bei der Interferon-Antwort (Bonjardim C.A. et al., 2009; Yoshimura A. et al., 2007). Die Autoren untersuchten die *SOCS1*-Promotor-Methylierung in Serum-Proben von HCV-Patienten zu Therapiebeginn, Therapieende (EOT, *end of treatment*) und 6 Monate nach Therapieende (F6). Sie demonstrierten eine fortlaufende Veränderung des Methylierungslevels im *SOCS1*-Promotor während der Therapie mit der höchsten Methylierung zum EOT in HCV-Patienten, die ein Therapie-Ansprechen zeigten (Tseng K-C. et al., 2013). Interessanterweise war die höhere *SOCS1*-Promotor-Methylierung erst zum Therapieende (EOT) signifikant mit Therapie-Ansprechen assoziiert, aber nicht zu Therapiebeginn oder sechs Monate nach Therapieende (F6) (Tseng K-C. et al., 2013). Die eigenen Untersuchungen wurden vor der Veröffentlichung dieser Publikation durchgeführt und wie zuvor beschrieben unter Berücksichtigung der Daten von Asselah T. et al. und Chen L. et al. in HCV-Patienten vor Therapie (Asselah T. et al., 2008; Chen L. et al., 2005). Daher ist es für weiterführende prospektive Untersuchungen interessant, auch im Verlauf einer IFN/RBV-Therapie mögliche Unterschiede in der *ISG15*-Promotor-Methylierung zu analysieren. Des Weiteren untersuchten Zekri et al. die Auswirkungen der Promotor-Methylierung einiger Gene auf das Therapie-Ansprechen in mit GT4 infizierten HCV-Patienten aus Ägypten und zwar ähnlich wie in der eigenen Arbeit vor Therapiebeginn (Zekri A-R. N. et al., 2014). Die Autoren demonstrierten, dass von sechs untersuchten Genen nur im Fall des Tumorsuppressorgens *MGMT* die Non-Responder eine höhere Promotor-Methylierung als Respondern aufwiesen (Zekri A-R. N. et al., 2014). Die *MGMT*-Methylierung korrelierte signifikant mit dem HCV-Patienten-Ansprechen auf die antivirale Therapie. *MGMT* spielt eine wichtige Rolle in der Zellprotektion durch Prävention von DNA-Schäden und Auslösen von DNA-Reparaturmechanismen. Die Promotor-Methylierung dieses Gens wird häufig in chronischen HCV-Patienten nachgewiesen (Li Z. et al., 2012). Auch Matsukura et al. zeigten eine signifikante Assoziation zwischen der *MGMT*-Promotor-Methylierung und der HCV-Infektion (Matsukura S. et al., 2003).

Im Vergleich zu der eigenen Analyse, die ein Kollektiv von zehn Probanden-Proben und 25 HCV-Patienten-Proben beinhaltete, haben Zekri et al. 53 HCV-Patienten-Proben und Tseng et al. insgesamt 106 Proben untersucht. Die Ergebnisse dieser Publikationen können nicht direkt in Relation zu den eigenen Daten gestellt werden, weil Tseng et al. erstens einen anderen

Schwerpunkt in ihrer Studie setzten, da sie die Promotor-Methylierung bei mehreren Zeitpunkten untersuchten und die Autoren die Veränderung des Methylierungslevels von *SOCS1* während des Therapieverlaufs analysierten. Zweitens präsentierten die Autoren ihre Ergebnisse in einer logarithmischen Darstellung. Die Untersuchung von Zekri et al. hatte einen ähnlichen Ansatzpunkt wie die eigene Arbeit, allerdings verwendeten die Autoren eine andere Detektionsmethode. Sie benutzen spezifische Oligonukleotide für methylierte und unmethylierte DNA und bestimmten nur die Anzahl der Patienten mit Promotor-Methylierung ohne Quantifizierung der eigentlichen Promotor-Methylierungsrate der einzelnen CpGs. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit der prozentuale Anteil der *ISG15*-Promotor-Methylierung durch quantitative Pyrosequenzierung ermittelt und daher nicht direkt mit den Daten von Zekri et al. vergleichbar. Die Anzahl der Patienten mit nachweisbaren Methylierungen in den sechs untersuchten Promotoren erscheint jedoch bei Zekri et al. mit 34-64% deutlich höher als im Fall des *ISG15*-Promotors zu sein. Methodisch bleibt offen, wie viele der Proben, die mit 1-15% Methylierung in dieser Dissertation im Vergleich zu einer nicht methylierten DNA-Kontrollprobe als eher unmethyliert bewertet wurden, in einer methylierungs-spezifischen PCR wie von Zekri et al. beschrieben als methyliert interpretiert worden wären.

Seit einigen Jahren steht die Analyse der DNA-Hypermethylierung von Promotoren diverser Gene in Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomkrankungen im Fokus der Forschung. Eine Hypermethylierung in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen ist eine bedeutende epigenetische Modifikation, die zur Deregulierung von einigen zellulären Prozessen beiträgt, die schließlich zur Initiierung und zum Fortschreiten von Karzinomen führt (Baylin S.B., Ohm J.E., 2006; Issa J., 2004). Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass verschiedene Krebsarten wie zum Beispiel das hepatozelluläre Karzinom (HCC) deutlich ausgeprägte DNA-Methylierungsprofile aufweisen (Yang B. et al., 2003; Yu J. et al., 2002). Andere Autoren beschrieben das Vorhandensein eines potentiellen HCV-induzierten HCC-Methylierungsprofils (Okamoto Y. et al., 2014; Zekri A-R.N. et al., 2014). Die Daten von Okamoto et al. zeigten, dass das Hepatitis C-Virus eine Rolle in der Beschleunigung von Methylierungsprozessen spielen könnte, welche in der HCC-Entwicklung sowie der Progression von HCV-assoziierten Lebererkrankungen involviert sind und möglicherweise das Therapie-Ansprechen von HCV-Patienten beeinflussen (Okamoto Y. et al., 2014). Des Weiteren demonstrierten Okamoto et al. im Mausmodell mit humanisierter Leber (*chimeric mice*), dass die Infektion mit HCV und HBV eine durch „Natural-Killer“-Zellen vermittelte angeborene Immunantwort zu aktivieren scheint (Okamoto Y. et al., 2014), die zur Induktion und Akkumulation einer veränderten DNA-Methylierung in humanen Hepatozyten beiträgt (Okamoto Y. et al., 2014).

IV.3 In vitro Untersuchung des Zusammenhanges zwischen ISG15 und miRNA-122 bei der HCV-Replikation

Für die zwei wirtseigenen Faktoren ISG15 und miRNA-122 wurde vor einigen Jahren demonstriert, dass beide eine bedeutende Rolle in der HCV-Pathogenese spielen (Broering R. et al., 2010; Chen L. et al., 2010b; Jopling C.L. et al., 2008). Deshalb wurden beide zelleigenen Moleküle in den letzten Jahren unabhängig voneinander als vielversprechende Angriffspunkte für neue Therapieoptionen angesehen (Broering R. et al., 2010; Janssen H.L.A. et al., 2013; Jopling C.L., 2012; Lanford R.E. et al., 2010; Real C. Dissertation, 2014). In den letzten Jahren standen beide Moleküle, ebenso wie die kürzlich zugelassenen Protease-Inhibitoren im Fokus der HCV-Forschung mit dem Ziel, eine Therapie mit höheren Heilungsraten in der Behandlung der chronischen HCV-Infektion zu erzielen, allein oder in Kombination mit IFN- α und Ribavirin (Broering R. et al., 2010; Janssen H.L.A. et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet, zum einen ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen ISG15 und miRNA-122 gibt und zum anderen, ob möglicherweise bei einer kombinierten Suppression der beiden Moleküle ein synergistischer, antiviraler Effekt in der HCV-Infektion erzielt werden kann. In eigenen Experimenten wurde durch Veränderung des intrazellulären miRNA-122-Levels dessen Auswirkung auf die *ISG15*-Expression und die HCV-Replikation analysiert (Abb. 18A-D). Dafür wurden ausgehend von den Vorarbeiten durch Broering et al. zwei Zeitpunkte (48 und 72 Stunden) gewählt, da zu mindestens bei einem Zeitpunkt (72 Stunden) in dieser Publikation, eine effiziente HCV-Inhibition erzielt wurde (Broering R. et al., 2010). In eigenen *in vitro* Experimenten (Abb. 18A-B) konnte gezeigt werden, dass miRNA-122-Mimik die HCV-Replikation steigerte, während miRNA-122-Hemmstoff eine signifikante Hemmung der HCV-Replikation bewirkte. Dennoch blieb in diesen Zellen trotz Veränderung des intrazellulären miRNA-122-Levels die *ISG15*-mRNA-Expression unverändert (Abb. 22C-D). Diese Daten zeigen, dass bei beiden Zeitpunkten ein Effekt von miRNA-122-Mimik und –Inhibitor auf die HCV-Replikation nachgewiesen wurde. Deshalb waren beide Zeitpunkte für eine solche Analyse geeignet. Die Daten liefern allerdings keinen Anhaltspunkt, dass unter den durchgeführten experimentellen Bedingungen ein Zusammenhang zwischen ISG15 und miRNA-122 besteht oder dass miRNA-122 die *ISG15*-mRNA reguliert (Abb. 18C-D). Die Ergebnisse legen nahe, dass keine direkte Interaktion zwischen miRNA-122 und der ISG15 besteht und beide Faktoren höchstwahrscheinlich unabhängig voneinander ihre Wirkung auf die HCV-Replikation ausüben.

Sarasin-Filipowicz et al. zeigten anhand von *in vivo*-Untersuchungen zwischen Non-Responder HCV-Patienten und Respondern, dass in Leberbiopsien von Non-Respondern im Vergleich zu Respondern vor Therapiebeginn sowohl geringere miRNA-122-Level als auch höhere ISGs-Level

nachgewiesen werden können (Sarasin-Filipowicz M. et al., 2009). Von den Autoren wurde vermutet, dass bei dieser negativen Korrelation zwischen miRNA-122-Expression und der *ISGs*-Genexpression möglicherweise kein kausaler Zusammenhang besteht. Einheitlich zu diesen Daten fanden Spaniel et al. anhand von Genearray-Analysen (Affymetrix) eine negative Korrelation zwischen der miRNA-122-Menge und der Genexpression von untersuchten *ISGs* (auch *ISG15*) in Nicht-Tumor-Lebergewebe von HCV-infizierten Patienten (Spaniel C. et al., 2013). Im Gegensatz dazu fanden Urban et al., dass in der von Ihnen untersuchten HCV-Patienten-Kohorte keine Assoziation zwischen den hepatischen miRNA-122-Leveln und der hepatischen *ISG15*-Genexpression nachweisbar war (Urban T.J. et al., 2010). Die Autoren vermuteten, dass die Signaltransduktionswege der beiden Moleküle unabhängig voneinander die antivirale Therapie beeinflussen (Urban T.J. et al., 2010). Diese publizierten Daten würden zu den eigenen Ergebnissen hinsichtlich der Hypothese von zwei unabhängigen Signalwegen passen.

Beide Moleküle, miRNA-122 und *ISG15*, beeinflussen unabhängig voneinander direkt die HCV-Vermehrung. Jopling et al. demonstrierten, dass miRNA-122 durch direkte Interaktion über zwei Bindestellen im 5'-UTR des HCV-Genoms die HCV-Vermehrung erhöht (Jopling C.L. et al., 2005; Jopling C.L. et al., 2008; Jopling C.L., 2012). Eine solche positive Regulation über Bindung in der 5'-UTR ist ein ungewöhnlicher Prozess bzw. bislang noch wenig erforschter Mechanismus, verglichen mit der üblichen Funktion von miRNAs in der Regulation der mRNA per 3'-UTR. Im Fall von *ISG15* ist die funktionelle Verbindung zwischen *ISG15* und dem HCV-Replikationszyklus noch nicht vollständig aufgeklärt. Chen et al. zeigten im infektiösen HCV-Zellkultursystem (HCV FL-J6/JFH) mit *full length* HCV-Genom, dass ISGylierung der hauptsächliche Mechanismus ist durch den *ISG15* die HCV-Vermehrung beeinflusst und nicht das freie *ISG15*-Protein (Chen L. et al., 2010b). Obwohl Chen et al. eine andere Zelllinie verwendeten als die in der vorliegenden Arbeit benutzte, könnte der von dieser Arbeitsgruppe nachgewiesene Effekt der ISGylierung in der HCV-Replikation in den Con1-Zellen analog sein. Real et al. analysierten *in vitro* im murinen subgenomischen HCV-Replikonsystem (MH1) und *in vivo* in C57BL/6-Mäusen die funktionelle Rolle von *ISG15* in der HCV-Replikation (Real C.I. et al., 2013). Die Autoren identifizierten fünf potentielle HCV-fördernde Effektor-Moleküle, *Hmgcs1* (*Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*), *Idh1* (*Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic*) und *Txndc5* (*Thioredoxin domain-containing protein5*), *HnrnpK* (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) und *HnrnpA3* (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3*), deren Menge durch die *ISG15*-mRNA-Suppression erniedrigt war (Real C.I. et al., 2013). Es wurde von Real et al. postuliert, dass diese Effektor-Proteine den proviralen Effekt von *ISG15* auf die HCV-Replikation vermitteln könnten. Die Proteine *Hmgcs1*, *Idh1* und *Txndc5* spielen eine Rolle im Lipid-Metabolismus, der für Eintritt, Replikation und Freisetzung von HCV bedeutend ist (Coller K.E. et al., 2012). Im Fall des Proteins *HnrnpK* ist bekannt, dass es mit dem HCV-Core-Protein interagiert (Hsieh T-Y. et al., 1998). Da Real et al.

demonstriert haben, dass erstens ISG15 die Proteinexpression von HnnpK reguliert und zweitens die siRNA-vermittelte HnnpK-Suppression zur HCV-Inhibition führt, wurde dieses Protein von den Autoren als direkter Vermittler des proviralen Effekts von ISG15 in der HCV-Replikation postuliert (Real C.I. et al., 2013). Für HnnpA3 wird vermutet, dass es wahrscheinlich im Ribonukleo-Protein-Komplex mit der HCV-RNA interagiert (Real C.I. et al., 2013).

Da die eigenen Untersuchungen vor der Veröffentlichung dieser Daten durchgeführt wurden, konnte die Analyse dieser Effektor-Proteine in den eigenen Experimenten nicht berücksichtigt werden. Die eigenen Daten erweitern bezüglich des miRNA-122- und des ISG15-abhängigen Mechanismus um weitere Belege die Hypothese für die Existenz zweier verschiedener Interaktionswege mit dem HCV. Auch die Überprüfung einer Sequenzhomologie zwischen der humanen *ISG15*-Sequenz und miRNA-122-Sequenz ergab mittels online-BLAST-Analyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) keinen Treffer bei der Suche.

Auf Anregung von Urban et al. wurde im zweiten Teil der Fragestellung nachgegangen, dass zukünftige HCV-Therapieformen unter Verwendung von beiden, einer miRNA-122- und IFN-Signalweg-abhängigen Methode einen synergistischen Effekt auf die HCV-Hemmung ausüben könnten (Urban T.J. et al., 2010). Dazu wurde durch kombinierte Suppression von *ISG15*-mRNA und miRNA-122 *in vitro* ein möglicher synergistischer, antiviraler Effekt untersucht. Es wurden die Zeitpunkte 48 und 72 Stunden gemessen, da in diesen Zeitpunkten eine signifikante HCV-Inhibition mit miRNA-122-Hemmstoff erzielt wurde. Ergänzend dazu erreichten Broering R. et al. in ihren Experimenten mit der siISG15 eine effiziente HCV-Inhibition von 52% nach 72 Stunden (Broering R. et al., 2010). Eigene Untersuchungen zeigten bei beiden Zeitpunkten, dass, obwohl mit siISG15 ein sehr effizienter *ISG15-knock down* erzielt wurde, die HCV-Suppression erst nach 72 Stunden signifikant war (Abb. 19A-D). An diesem Zeitpunkt (Abb. 19D) wurde eine ca. 50% HCV-Inhibition erzielt, die genauso effektiv war wie in Daten von Broering et al. (Broering R. et al., 2010). Die mit miRNA-122-Hemmstoff vermittelte HCV-Inhibition war ähnlich wie mit siISG15, erst nach 72 Stunden deutlicher (siehe Abb. 19C-D). Der Grund dafür, dass die Hemmung der HCV-Replikation beim späteren Zeitpunkt deutlicher zu sehen ist, liegt am subgenomischen HCV-Replikon in den Con1-Zellen, das anhand von Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe bekannt ist. Beim Vergleich von siISG15 vs. miRNA-122-Hemmstoff war ersichtlich, dass die Suppression von miRNA-122 einen etwas stärkeren Effekt auf die HCV-Replikation hatte als die *ISG15*-mRNA-Suppression (siehe Abb. 19C-D). Es könnte entweder daran liegen, dass der miRNA-122-Hemmstoff eine höhere Affinität zu miRNA-122 hatte und dadurch effektiver war als die verwendete siRNA gegen *ISG15*-mRNA. Alternativ könnte die miRNA-122-Suppression einen stärkeren hemmenden Effekt auf HCV als die *ISG15*-Suppression haben, da miRNA-122 eine bedeutendere Rolle in der HCV-Replikation spielt als ISG15. In der Literatur gibt es keine Hinweise auf eine größere oder schwächere Beteiligung der beiden Moleküle an der HCV-

Replikation. Es ist jedoch vorstellbar, dass die miRNA-122 durch seine direkte Interaktion mit dem HCV-Genom einen größeren Einfluss auf die HCV-Vermehrung hat als ISG15 durch den ISGylierungs-Prozess.

Die Kombination aus siISG15 und miRNA-122-Hemmstoff hatte eine vergleichbar starke Auswirkung auf die HCV-Replikation wie der Einsatz von miRNA-122-Hemmstoff allein (Abb. 19C-D). Daher schien die kombinierte Suppression beider Faktoren *in vitro* nicht die HCV-Inhibition zu verstärken. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass *in vitro* kein synergistischer Effekt auf die HCV-Inhibition durch kombinierte Suppression von *ISG15* und miRNA-122 erzielt wurde, obwohl die Suppression der jeweils einzelnen Faktoren *in vitro* effizient war. Literaturdaten, die *in vitro* oder *in vivo* einen solchen synergistischen Effekt bei der HCV-Hemmung erforscht haben, liegen aktuell nicht vor. Daher liefern die Daten dieser Arbeit erste Hinweise zu diesem Thema und legen nahe, dass in der HCV-Therapie der Einsatz einer Kombination aus der siRNA gegen *ISG15*-mRNA und des miRNA-122-Inhibitors vermutlich keinen zusätzlichen antiviralen Effekt bringen würde. Der Einsatz von siISG15 wurde kürzlich im Mausmodell getestet (Real C. Dissertation, 2014) und auch der Einsatz des Antisense-miRNA-122-Oligonukleotids, Miravirsen (Firma Santaris Pharma) wurde bereits in klinischen Studien zuletzt in Phase IIa untersucht und zeigte eine vielversprechende, effektive HCV-Inhibition (Janssen H.L.A. et al., 2013). Es ist denkbar, dass diese Substanzen entweder allein oder jeweils in Kombination mit IFN- α und Ribavirin eine weitere Therapieoption darstellen könnten. Denn obwohl durch die aktuelle Zulassungen von verschiedener Protease-Inhibitoren ein gutes Therapie-Ansprechen bei HCV-Patienten erzielt werden kann, muss berücksichtigt werden, dass diese Therapieform derzeit noch sehr kostenintensiv ist und deshalb in der Klinik nicht bei allen HCV-Patienten angewendet wird (Sarrazin C. et al., 2015).

V Zusammenfassung:

Diese Arbeit beschäftigte sich mit genetischen Untersuchungen des humanen *Interferon stimulated gene 15*-Promotors (*ISG15*) mit dem Ziel mögliche ursächliche Faktoren zu identifizieren, die mit dem Nicht-Ansprechen auf eine Interferon-Therapie (IFN) von Hepatitis-C-Virus-Patienten (HCV) zusammenhängen. Es wurden im kleinen Kollektiv drei *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP): bei rs2341365 Adenin (A)/Guanin (G), rs4615788 Cytosin (C)/ Guanin (G) und SNP rs60637872 (CAA/---) ein genetischer Polymorphismus nachgewiesen. Dieser Polymorphismus wurde erstens häufiger im HCV- als im Norm-Kollektiv identifiziert. Zweitens deuten die eigenen Daten darauf hin, dass die drei SNPs im Kopplungsungleichgewicht stehen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Analyse des Polymorphismus auf eine größere Kohorte ausgeweitet. Dabei wurde repräsentativ der SNP rs60637872 untersucht. Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen der kleinen und großen Kohorte einen Trend mit dem häufigeren Vorkommen der Heterozygotie im HCV-Kollektiv. Dabei handelte es sich um eine mehr als fünffach erhöhte Häufigkeit der Heterozygotie bei SNP rs60637872 in der HCV-Patienten-Kohorte (12,2%) im Vergleich zur Norm-Kohorte (2,4%). Des Weiteren korrelierte die Heterozygotie im HCV-Kollektiv tendenziell mit dem Nicht-Ansprechen auf die IFN-Therapie und ihrem Vorkommen in HCV-Patienten mit verschiedenen viralen Genotypen (GT). Der heterozygote Genotyp (CAA/---) kam fast doppelt so häufig in Non-Respondern (19,4%) vor im Vergleich zu Therapie-Respondern (9,2%), Relapsen (6,9%) oder HCV-Patienten mit einem virologischem Durchbruch unter Therapie (12,5%). Der heterozygote Genotyp kam außerdem am häufigsten in infizierten HCV-Patienten mit GT4 (25%) und am seltensten in HCV-Patienten mit GT3 (3,8%) vor. Die Untersuchung der *Desoxyribonucleic acid*-Methylierung (DNA) im *ISG15*-Promotor ergab eine geringe Cytosin-Methylierung bei den untersuchten Probanden und HCV-Patienten. Das deutet darauf hin, dass in der Probanden- und der HCV-Patienten-Kohorte die Cytosine der Cytosin phosphatidyl Guanin-Dinukleotide (CpG) eher unmethyliert vorlagen. Vermutlich ist der *ISG15*-Promotor in diesen Proben transkriptionell aktiv und nicht durch Methylierung inhibiert. Nur in einer DNA-Probe (Therapieversager) wurde eine höhere Cytosin-Methylierung nachgewiesen. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro* Experimenten gezeigt, dass *microRNA122*-Mimik (miRNA-122) die HCV-Replikation steigerte, während miRNA-122-Hemmstoff eine signifikante Hemmung der HCV-Replikation bewirkte. Interessanterweise blieb die *ISG15*-Genexpression in diesen Zellen trotz Veränderung des intrazellulären miRNA-122-Levelns unverändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass wahrscheinlich keine direkte Interaktion zwischen miRNA-122 und *ISG15* besteht und beide Faktoren höchstwahrscheinlich unabhängig voneinander ihre Wirkung auf die HCV-Replikation ausüben. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass *in vitro* kein synergistischer Effekt auf die HCV-Inhibition durch kombinierte Suppression von *ISG15* und miRNA-122 erzielt wurde.

VI Literaturverzeichnis:

- 1. Abe, H., Hayes, C.N., Ochi, H., Maekawa, T., Tsuge, M., Miki, D., Mitsui, F., Hiraga, N., Imamura, M., Takahashi, S., Kubo, M., Nakamura, Y., Chayama, K. (2011):** IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J. Hepatol.* 54(6), 1094-1101
- 2. Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., and Lundeberg, J. (2000):** Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analyt. Biochem.* 280, 103-110
- 3. Antaki, N., Craxi, A., Kamal, S., Moucari, R., Van der Merwe, S., Haffar, S., Gadano, A., Zein, N., Lai, C.L., Pawlotsky, J-M., Heathcote, E.J., Dusheiko, G., Marcellin, P. (2009):** The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int.* 30(3), 342-355
- 4. Antonelli, G., Simeoni, E., Turriziani, O., Tesoro, R., Redaelli, A., Roffi, L., Antonelli, L., Pistello, M., Dianzani, F. (1999):** Correlation of interferon-induced expression of MxA mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the response of patients with chronic active hepatitis C to IFN-alpha therapy. *J. Interferon Cytokine Res.* 19(3), 243-251
- 5. Appel, N., Schaller, T., Penin, F., Bartenschlager, R. (2006):** From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J. Biol. Chem.* 281, 9833-9836
- 6. Asselah, T., Bieche, I., Narguet S., Sabbagh, A., Laurendeau, I., Ripault, M-P., Boyer, N., Martinot-Peignoux, M., Valla, D., Vidaud, M., Marcellin, P. (2008):** Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut.* 57, 516-524
- 7. Asselah, T., Bieche, I., Sabbagh, A., Bedossa, P., Moreau, R., Valla, D., Vidaud, M., Marcellin, P. (2009):** Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut.* 58, 846-858
- 8. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T. (2003):** A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 9 (3), 277-279
- 9. Balagopal, A., Thomas, D.L. and Thio, C.L. (2010):** IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol.* 139(6), 1865-1876
- 10. Barnes, M.R. (2002):** SNP and mutation data on the web – hidden treasures for uncovering. *Comp. Funct. Genom.* 3, 67–74.
- 11. Bartel, D.P., Chen, C.Z. (2004):** Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 5, 396-400
- 12. Bartenschlager, R., Lohmann, V. (2000):** Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14, 241-254
- 13. Baylin, S.B., Ohm, J.E. (2006):** Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer.* 6, 107-116
- 14. Beier, V. (2004):** Charakterisierung von DNA-Methylierungsmustern: mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays. *Bioforum.* 5, 31-33
- 15. Bird, A. (2002):** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Dev.* 16, 6-21
- 16. Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. (2009):** Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.* 122(1), 1-11

- 17. Brodsky, L.I, Wahed, A.S., Li, J., Tavis, J.E., Tsukahara, T., Taylor, M.W. (2007):** A novel unsupervised method to identify genes important in the anti-viral response: application to interferon/ribavirin in hepatitis C patients. *PLoS one.* 2 (7), e584
- 18. Broering, R., Zhang, X., Kottlil, S., Trippler, M., Jiang, M., Lu, M., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2010):** The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response. *Gut.* 59, 1111-1119.
- 19. Chakravarti, A. (2001):** Single nucleotide polymorphisms:...to a future of genetic medicine. *Nature.* 409, 822-823
- 20. Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L-L., Coltescu, C., Heathcote, J., Edwards, A.M., McGilvray, I.D. (2005):** Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterol.* 128, 1437-1444
- 21. Chen, L., Borozan, I., Sun, J., Guindi, M., Fischer, S., Feld, J., Anand, N., Heathcote, J., Edwards, A.M., McGilvray, I.D. (2010b):** Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterol.* 138, 1123-1133
- 22. Chen, L., Sun, J., Meng, L., Heathcote, J., Edwards, A.M., McGilvray, I.D. (2010a):** ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production *in vitro*: implications for chronic infection and response to treatment. *J. Gener. Virology.* 91, 382-388
- 23. Chen, L., Li, S., McGilvray, I.D. (2011):** The ISG15/USP18 ubiquitin-like pathway (ISGylation system) in hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *The International J. Biochem. & Cell Biol.* 43, 1427-1431
- 24. Chen, X-M. (2009):** MicroRNA signatures in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 15(14), 1665-1672
- 25. Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. & Houghton, M., (1989):** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244(4902), 359-362.
- 26. Cichon, S., Freudenberg, J., Propping, P., Nöthen, M.M. (2002):** Variabilität im menschlichen Genom. *Deutsches Ärzteblatt.* 99(46), 3091-3101
- 27. Clemens, M.J.; Vaquero, C.M. (1978):** Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: Evidence for activation of an endoribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83(1),59-68.
- 28. Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., Randall, G. (2012):** Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* 8(1), e1002466
- 29. Deaton, A.M., Bird, A. (2011):** CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Dev.* 25, 1010-1022
- 30. D’Cunha, J., Knight, Jr. E., Haas, A.L., Truitt, R.L., Borden, E.C. (1996):** Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93 (1), 211-215
- 31. Dejeux, E., Audard, V., Cavard, C., Gut, I.G., Terris, B., Tost, J. (2007):** Rapid identification of promoter hypermethylation in hepatocellular carcinoma by pyrosequencing of etiologically homogeneous sample pools. *J. Mol. Diagnost.* 9(4), 510-520
- 32. Dejeux, E., El abdalaoui, H., Gut, I.G., Tost, J. (2009):** Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. *Methods Mol. Biol.* 507, 189-205

- 33. Delaney, W.E. (2013):** Molecular virology of chronic hepatitis B and C: parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome. *Elsevier Antiviral Res.* 99(1), 34-48
- 34. Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Dubuisson, J. (1997):** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* 71, 697-704
- 35. Durfee, L.A., Lyon, N., Seo, K., Huibregste, J.M. (2010):** The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol. Cell.* 38, 722-732
- 36. Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B.A., Freier, S., Bennett, C.F., Bhanot, S., Monia, B.P. (2006):** miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87-98
- 37. Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., Wang, K. (2011):** Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat. Res.* 717(1-2), 85-90
- 38. Farrell, P.J., Broeze, R.J., Lengyel, P. (1979):** Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature.* 279(5713), 523-525
- 39. Fearon, D.T., Locksley, R.M. (1996):** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 272, 50-54
- 40. Feinberg, A. (2001):** Cancer epigenetics takes center stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 392-394
- 41. Fernández, M., Quiroga, J.A., Martín, J., Herrero, M., Pardo, M., Horisberger, M.A., Carreño, V. (1999):** In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 180(2), 262-267
- 42. Floyd-Smith, G., Slattery, E., Lengyel, P. (1981):** Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5') oligoadenylate-dependent endonuclease. *Science.* 212, 1030-1032
- 43. Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., Gale, M., Jr. (2005):** Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2986-2991.
- 44. Freudenberg, J., Cichon, S., Nöthen, M.M., Propping, P. (2002):** Blockstruktur des menschlichen Genoms. *Deut. Ärztebl.* 99, 3190-3195
- 45. Fried, M.W. (2002):** Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology.* 36, 237-244
- 46. Fried, M.W., Schiffman, M.L., Reddy, R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves, F.L. Jr, Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. (2002):** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347(13), 975-982
- 47. Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987):** CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196(2), 261-282
- 48. Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J. Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B. (2009):** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399-401

- 49. Glue, P., Fang, J.W., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S.K., Salfi, M., Jacobs, S. (2000):** Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 556-567
- 50. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993):** A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10583-10587
- 51. Gray, I.C., Campbell, D.A., Spurr, N.K. (2000):** Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum. Mol. Genet.* 9 (16), 2403-2408
- 52. Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M., Rowlands, D.J. (2004):** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadinesensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J. Gen. Virol.* 85, 451-461
- 53. Griffiths-Jones, S. (2004):** The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 32, 109-111
- 54. Griffiths-Jones, S. Saini, H.K., Van Dongen, S., Enright, A.J. (2008):** miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, 154-158
- 55. Harty, R.N., Pitha, P.M., Okumura, A. (2009):** Antiviral activity of innate immune protein ISG15. *J. Innate Immun.* 1(5), 397-404
- 56. Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., Niepmann, M. (2008):** MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J.* 27, 3300-3310
- 57. Henke, J.I. (2010):** Einfluss der leberspezifischen microRNA-122 auf die Regulation der Translation der Hepatitis-C-Virus-RNA. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- 58. Hijikata, M., Ohta, Y., Mishiro, S. (2000):** Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology.* 43(2), 124-127
- 59. Hoffmann, T.W., Gilles, D., Abderrahmane, B. (2012):** MicroRNAs and hepatitis C virus: Toward the end of miR-122 supremacy. *Virol. J.* 9, 109
- 60. Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S., Lindenmeier, G. (2005):** *Biochemie des Menschen*. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verl; s. bes. S. 302-304.
- 61. Hsieh, T.Y., Matsumoto, M., Chou, H.C., Schneider, R., Hwang, S.B., Lee, A.S., Lai, M.M. (1998):** Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J. Biol. Chem.* 273(28), 17651-17659
- 62. Hüppe, D., Zehnter, E., Mauss, S., Böker, K., Lutz, T., Racky, S., Schmidt, W., Ullrich, J., Sbrijer, I., Heyne, R., Schober, A., John, C., Hey, K-H., Bokemeyer, B., Kallinowski, B., Möller, B., Pape, S., Gutmann, M., Alshuth, U., Niederau C. (2008):** Epidemiology of chronic hepatitis C in Germany — an analysis of 10,326 patients in hepatitis centres and outpatient units. *Z. Gastroenterol.* 46 (1), 34-44
- 63. Ikeda, M., Yi, M.K., Li, K., Lemon, S.M. (2002):** Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of Hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J. Virol.* 76, 2997-3006
- 64. Issa, J. (2004):** CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 4, 988-993
- 65. Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola,**

- R., Terg, R.A., Yoshida, E.M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A.J., Kieffer, T.L., George, S., Kauffman, R.S., Zeuzem, S. (2011): Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 2405-2416
66. Jalvy-Delvaile, S., Maruel, M., Majo, V., Pierre, N., Chabas, S., Combe, C., Rosenbaum, J., Saggiocco, F., Grosset, C.F. (2012): Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res.* 40, 1356-1365
67. Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A., Hodges, M.R. (2013): Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 368(18), 1685-1694
68. Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., Rice, C.M. (2007): Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81, 8374-8383
69. Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. Sarnow, P. (2005): Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science.* 309, 1577-1581
70. Jopling, C.L. (2008): Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1220-1223
71. Jopling, C.L., Schütz, S., Sarnow, P. (2008): Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122 binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe.* 4 (1), 77-85
72. Jopling, C.L. (2012): Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *Landes Bioscience.* 9(2), 1-6
73. Kanazawa, N., Kurosaki, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Itsui, Y., Yamashiro, T., Tanabe, Y., Maekawa, S., Nakagawa, M., Chen, C-H., Kakinuma, S., Oshima, S., Nakamura, T., Kato, T., Wakita, T., Watanabe, M. (2004): Regulation of Hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J. Virol.* 78 (18), 9713-9720
74. Kato, A., Homma, T., Batchelor, J., Hashimoto, N., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H., Matsumoto, K. (2003): Interferon- α/β receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006. *BMC Immunol.* 4, 8
75. Katze, M.G., He, Y., Gale, M. (2002): Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunol.* 2, 675-687
76. Kim, K.I., Yan, M., Malakhova, O., Luo, J.K., Shen, M.F., Zou, W., de la Torre, J.C., Zhang, D.E. (2006): Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling. *Mol Cell Biol.* 26 (2), 472-479
77. Kim, M-J., Yoo, J-Y. (2010): Inhibition of hepatitis C virus replication by IFN-mediated ISGylation of HCV-NS5A. *J. Immunol.* 185 (7), 4311-4318
78. Kiss, T. (2002): Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell.* 109, 145-148
79. Knight, Jr. E., Fahey, D., Cordova, B., Hillman, M., Kutny, R., Reich, N., Blomstrom, D. (1988): A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *J Biol Chem.* 263 (10), 4520-4522
80. Kotenko, S.V., Langer, J.A. (2004): Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int. Immunopharmacol.* 4(5):593-608.
81. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735-739

82. Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H. (2010): Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 327, 198-201
83. Larrea, E., Aldabe, R., Molano, E., Fernandez-Rodriguez, C.M., Ametzazurra, A., Civeira, M.P., Prieto, J. (2006): Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: *in vivo* and *in vitro* studies. *Gut*. 55, 1188-1196
84. Lavanchy D. (2011): Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 17. 107-15
85. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23(20), 4051-4060
86. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N. (2003): The nuclear RNaseIII Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425, 415-419
87. Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., García-Sastre, A., Leib, D.A., Pekosz, A., Knobloch, K.-P., Horak, I., Virgin, H.W. (2007): IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes and sindbis viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104(4), 1371-1376
88. Li, Z., Zhang, H., Yang, J., Hao, T., Li, S. (2012): Promoter hypermethylation of DNA damage response genes in hepatocellular carcinoma. *Cell Biology Intern*. 36, 427-432
89. Lindenbach, B.D., Rice, C.M. (2005): Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 436, 933-938
90. Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., Bartenschlager, R. (1997): Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol*. 71, 8416-8428
91. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999): Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285 (5424), 110-113.
92. Malakhov, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C., Zhang, D.E. (2003): High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J. Biol. Chem*. 278(19), 16608-16613
93. Malcolm, B.A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., Chase, R., Gheyas, F., Hart, A., Hesk, D., Ingravallo, P., Jiang, C., Kong, R., Lu, J., Pichardo, J., Prongay, A., Skelton, A., Tong, X., Venkatraman, S., Xia, E., Girijavallabhan, V., Njoroge, F. G. (2006): SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob. Agents Chemother* 50, 1013-1020
94. Matsukura, S., Soejima, H., Nakagawachi, T., Yakushiji, H., Ogawa, A., Fukuhara, M., Miyazaki, K., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Mukai, T. (2003): CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection. *Br. J. Cancer*. 88(4), 521-529
95. Medhi, S., Deka, M., Deka, P., Swargiary, S.S., Hazam, R.K., Sharma, M.P., Gumma, P.K., Asim, M., Kar, P. (2011): Promoter region polymorphism & expression profile of toll like receptor-3 (TLR-3) gene in chronic hepatitis C virus (HCV) patients from India. *Indian J. Med. Res*. 134(2), 200-207
96. Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 1(2), 135-145

97. Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S. (2008): Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 454 (7205), 766-770
98. Mund, C., Beier, V., Bewerunge, P., Dahms, M., Lyko, F., Hoheisel, J.D. (2005): Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of the tumour suppressor gene *p16^{INK4A}* promoter in colon carcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res.* 33 (8), e73
99. Mund, C., Brueckner, B., Lyko, F. (2006): Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA Methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Landes Bioscience*. 1 (1), 7-13
100. Mülhardt, C. (2006): Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 5. Auflage. Hrsg. Spektrum Akademischer Verlag; s. bes. S. 105-110; 120.
101. Nakajima, H., Shimomura, H., Iwasaki, Y., Ikeda, F., Umeoka, F., Chengyu, P., Taniguchi, H., Ohnishi, Y., Takagi, S.-J., Fujioka, S., Shiratori, Y. (2003): Anti-viral actions and viral dynamics in the early phase of three different regimens of interferon treatment for chronic hepatitis C: differences between the twice-daily administration of interferon-beta treatment and the combination therapy with interferon-alpha plus ribavirin. *Acta Med.* 57 (5), 217-225
102. Neumann, R. (2000): SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Laborjournal, Online-Publikation; www.laborjournal/ausgabe_10
103. Nguyen, M.H. and Keffee E.B. (2005): Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3 (10 Suppl 2), 97-101
104. Okamoto, Y., Shinjo, K., Shimizu, Y., Sano, T., Yamao, K., Gao, W., Fujii, M., Osada, H., Sekido, Y., Murakami, S., Tanaka, Y., Joh, T., Sato, S., Takahashi, S., Wakita, T., Zhu, J., Issa, J.-P., Kondo, Y. (2014): Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterol.* 146(2), 562-572
105. Perni, R.B., Almquist, S.J., Byrn, R.A., Chandorkar, G., Chaturvedi, P.R., Courtney, L.F., Decker, C.J., Dinehart, K., Gates, C.A., Harbeson, S.L., Heiser, A., Kalkeri, G., Kolaczowski, E., Lin, K., Luong, Y.P., Rao, B.G., Taylor, W.P., Thomson, J.A., Tung, R.D., Wei, Y., Kwong, A.D., Lin, C. (2006): Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 899-909
106. Pfaffl, M.W., Hageleit, M. (2001): Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Letters.* 23, 275-282
107. Pfaffl, M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspekt. Sonderausgabe PCR.* 10, 92-95
108. Poordad, F., McCone, J.Jr., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., DiNubile, M.J., Sniukiene, V., Brass, C.A., Albrecht, J.K., Bronowicki, J.-P. (2011): Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1195-1206
109. Poynard, T., Yuen, M-F., Ratziu, V., Lai, C.L. (2003): Viral hepatitis C. *Lancet.* 362, 2095-2100
110. Qiagen (2010): PyroMark® Q24 CpG LINE-1 Handbook. For quantification of methylation level of the LINE-1 retrotransposable element; s. bes. S. 8, 11-12
111. Qiagen (2010): Pyrosequencing®-the synergy of sequencing and quantification. A new standard in epigenetic and genetic analysis; s. bes. S. 3-5, 14
112. Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., Di Iulio, J., Mueller, T., Bochud, M., Battgay, M., Bernasconi, E., Borovicka, J., Colombo, S., Cerny, A., Dufour, J.F., Furrer, H., Gunthard,

- H.F., Heim, M., Hirschel, B., Malinverni, R., Moradpour, D., Müllhaupt, B., Witteck, A., Beckmann, J.S., Berg, T., Bergmann, S., Negro, F., Telenti, A., Bochud, P.Y. (2010): Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure- a genome-wide association study. *Gastroenterol.* 138(4), 1338-45
113. Ray, S.C., Arthur, R.R., Carella, A., Bukh, J., Thomas, D.L. (2000): Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout egypt. *J. Infect. Dis.* 182(3), 698-707
114. Real, C.I., Megger, D.A., Sitek, B., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L.M., John, M.J., Walker, A., Timm, J., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Gerken, G., Broering, R., Schlaak, J.F. (2013): Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon stimulated gene 15 in hepatitis C virus replication. *Antiviral Res.* 100(3), 654-661
115. Real, C.I. (2014): Entwicklung siRNA basierter Therapieansätze im Mausmodell am Beispiel viraler Hepatitiden. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
116. Recht, M., Borden, E.C., Knight, E. Jr. (1991): A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J. Immunol.* 147(8), 2617-2623
117. Rice, C.M., You, S. (2005): Treating hepatitis C: can you teach old dogs new tricks? *Hepatology.* 42(6), 1455-8.
118. Ronaghi, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3-11
119. Ronge, R. (2011): Individualisierte Therapiedauer bei Behandlung mit Peginterferon und Ribavirin. *Gastroenterol.* 141, 1656-1664
120. Sadler, A.J., Williams, B.R.G. (2008): Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (7), 559-568
121. Samuel, C.E. (2001): Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4), 778–809.
122. Sarrazin, C, Berg, T., Buggisch, P., Dollinger, M., Hinrichsen, H., Hüppe, D., Manns, M., Mauss, S., Petersen, J., Simon, K-G., van Thiel, I., Wedemeyer, H., Zeuzem, S. (2015): Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. Online-Publikation. <http://www.dgvs.de/>
123. Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M.H., Filipowicz, W. (2009): Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat. Med.* 15(1), 31-33
124. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.-M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.-J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A. (2005): Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 42, 962-973
125. Schoggins, J.W., Rice, C.M. (2011): Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 1(6), 519-525
126. Schork, N.J., Fallin, D., Lanchbury, J.S. (2000): Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin. Genet.* 58, 250-264
127. Seeff, L.B. (2002): Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 36(1), 35-46
128. Smuts, H.E., Kannemeyer, J. (1995): Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 33(6), 1679-1681

- 129. Spaniel, C., Honda, M., Selitsky, S.R., Yamane, D., Shimakami, T., Kaneko, S., Lanford, R.E., Lemon, S.M. (2013):** microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. *PLoS One*. 8(10), e76867
- 130. Stoneking, M. (2001):** Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past... *Nature*. 409, 821-822
- 131. Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2003):** *Biochemie*. 5. Aufl.; Heidelberg, Berlin: Deutschland Hrsg. Spektrum Akademischer Verl.; s. bes. S. 268-269
- 132. Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G.J., Booth, D.R., George, J. (2009):** IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 41(10), 1100-1104
- 133. Suzuki, F., Arase, Y., Suzuki, Y., Tsubota, A., Akuta, N., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Ikeda, K., Kobayashi, M., Matsuda, M., Takagi, K., Satoh, J., Kumada, H. (2004):** Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J. Viral Hepat.* 11, 271-276
- 134. Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi, F., Izumi, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. (2009):** Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 41(10), 1105-1109
- 135. Thiel, T.H., Collett, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Houghton, M., Meyers, G., et al. Flaviviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., eds. (2005):** *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the ICTV. 979-996
- 136. Tseng, K.-C., Chou, J.-L., Huang, H.-B., Tseng, C.-W., Wu, S.-F., Chan M.W.Y. (2013):** SOCS-1 promoter methylation and treatment response in chronic hepatitis C patients receiving pegylated-interferon/ribavirin. *J. of clinical Immunol.* 33(6), 1110-1116
- 137. Urban, T.J., Thompson, A.J., Bradrick, S.S., Fellay, J., Schuppan, D., Cronin, K.D., Hong, L., McKenzie, A., Patel, K., Shianna, K.V., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Afdhal, N. (2010):** IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 52(6), 1888-1896
- 138. Verbeeck, J., Maes, P., Lemey, P., Pybus, O.G., Wollants, E., Song, E., Nevens, F., Fevery, J., Delport, W., Van der Merwe, S., Van Ranst, M. (2006):** Investigating the origin and spread of hepatitis C virus genotypes 5a. *J. Virol.* 80 (9) 4220-4226
- 139. Weiner, M.P., Hudson, T.J. (2002):** Introduction to SNPs: Discovery of markers for disease. *Biotechn.* 32, 4-13
- 140. Xu, Q., Jiang, Y., Yin, Y., Li, Q., He, J., Jing, Y., Qi, Y-T., Xu, Q., Li, W., Lu, B., Peiper, S.S., Jiang, B-H., Liu, L-Z. (2012):** A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J. Mol. Cell Biol.* 0, 1-11
- 141. Yang, B., Guo, M., Herman, J.G., Clark, D.P. (2003):** Aberrant promoter methylation proAles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J. Pathol.* 163, 1101-1107
- 142. Yi, M., Lemon, S.M. (2004):** Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh7 cells. *J. Virol.* 78, 7904-7915

- 143. Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T., Lemon, S.M. (2006):** Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 2310-2315
- 144. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R. (2003):** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 17, 3011-3016
- 145. Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M. (2007):** SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nat. Rev. Immunol. 7(6), 454-465
- 146. Yu, J., Ni, M., Xu, J., Zhang, H., Gao, B., Gu, J., Chen, J., Zhang, L., Wu, M., Zhen, S., Zhu, J. (2002):** Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. BMC Cancer. 2, 29
- 147. Yuan, K., Lian, Z., Sun, B., Clayton, M.M., Ng, I.O.L., Feitelson, M.A. (2012):** Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. PLoS one. 7(4), e35331
- 148. Zekri, A.-R.N., Raafat, A.M., Elmasry, S., Bahnassy, A.A., Saad, Y., Dabaon, H.A., El-Kassas, M., Shousha, H.I., Nassar, A.A., El-Dosouky, M.A., Hussein, N. (2014):** Promotor methylation: does it affect response to therapy in chronic hepatitis C (G4) or fibrosis? Annals of Hepatol. 13(5), 518-524
- 149. Zeuzem, S., Andreone, P., Pol, S., Lawitz, E., Diago, M., Roberts, S., Focaccia, R., Younossi, Z., Foster, G.R., Horban, A., Ferenci, P., Nevens, F., Müllhaupt, B., Pockros, P., Terg, R., Shouval, D., van Hoek, B., Weiland, O., Van Heeswijk, R., De Meyer, S., Luo, D., Boogaerts, G., Polo, R., Picchio, G., Beumont, M. (2011):** Telaprevir for retreatment of HCV infection. N. Engl. J. Med. 364(25), 2417-2428
- 150. Zhang, D., Zhang, D.E. (2011):** Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. J Interferon Cytokine Res. 31(1), 119-130
- 151. Zhao, C., Beaudenon, S.L., Kelley, M.L., Waddell, M.B., Yuan, W., Schulman, B.A., Huibregtse, J.M., Krug, R.M. (2004):** The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 7578-7582.
- 152. Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J.M., Gygi, S., Krug, R. M. (2005):** Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 10200-10205
- 153. Zhao, C., Hsiang, T.Y., Kuo, R.L., Krug, R.M. (2010):** ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 2253-2258
- 154. Zhu, J. (2006):** DNA methylation and hepatocellular carcinoma. J. Hepatobiliary Pancreat Surg. 13(4), 265-273
- 155. Zieger, R., Gebhardt, J., Rohayem, J. (2010):** Effizientes *gene silencing* durch potente und serumstabile siRNA. BIOSpekt. 07, 782-784
- 156. Zipprich, A., Dollinger, M. (2010):** Hepatitis C- die vernachlässigten Genotypen. Hepatitis & more. 2, 18-20
- 157. Zou, W., Zhang, D.E. (2006):** The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. J. Biol. Chem. 281(7), 3989-3994

VII Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CpG	Cytosin phosphatidyl Guanin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFP	<i>estrogen-responsive finger protein</i>
ERK1	<i>extracellular signal-regulated kinase 1</i>
FKS	Fötale Kälber Serum
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GT	Genotyp
h	Stunde
HCV	Hepatitis-C-Virus
HERC5	<i>Hect domain and RLD5</i>
H ₂ O	Wasser
IFI35	<i>interferon induced protein 35</i>
IFN	Interferon
IFN α	Interferon-alpha
IFN β	Interferon-beta
IFN γ	Interferon-gamma
IRF1	<i>interferon regulatory factor 1</i>
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISG15	Interferon stimuliertes Gen 15
ISRE	<i>interferon-stimulated response elements</i>
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min	Minute
miRNA	<i>microRNA</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MxA	<i>myxovirus resistance A</i>
NK	natürliche Killerzellen
nM	Nanomol
NR	<i>Non-Responder</i>
OASL	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase like</i>
OAS2	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pi	anorganisches Phosphat

Abkürzungsverzeichnis

PKR	EIF2AK2, <i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase2</i>
PPi	Pyrophosphat
Pri-miRNA	primäre miRNA
Pre-miRNA	miRNA-Vorläufer
PSMB9	<i>proteasome subunit beta type 9</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit (engl. <i>real-time</i>) Reverse Transkription-PCR
RBV	Ribavirin
RIG-1	<i>retinoic acid-inducible gene-1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVR	<i>sustained viral response</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Ube1L	<i>ubiquitin-activating enzyme E1-like</i>
UbCH8	<i>UBE2L6 ubiquitin-conjugating enzyme E2L6</i>
USP18	<i>ubiquitin-like specific peptidase 18</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>

VIII Danksagung:

Ich danke Herr Prof. Dr. med. Guido Gerken für seine große Unterstützung und die Möglichkeit in seiner Abteilung diese Doktorarbeit zu erstellen. Herrn Prof. Dr. med. Jörg Friedrich Schlaak danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Trippler sei herzlich gedankt für seine Hilfsbereitschaft, die Einführung in die Pyrosequenzier-Technologie, die hilfreichen Ideen rund um das Thema Genetik und die Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Ruth Bröring danke ich für die Einführung in die Zellkultur, die Bereitstellung von Con1-Zellen und diverser siRNAs, sowie die Durchsicht meiner Arbeit.

Ganz herzlich danke ich Frau Mechthild Beste für ihre tatkräftige Unterstützung, insbesondere für Ihre Motivation, Diskussionsbereitschaft und die Hilfestellung in der SNP-Thematik. Ich möchte auch Frau Dr. Inka Scheffrahn für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen interessanten, wissenschaftlichen Diskussionen ganz herzlich danken.

Frau MSc (Biomed. Ing.) Anastasia Hübener, Frau Dr. (PhD) Carolina Hoyo-Becerra und Frau Dr. Catherine Real danke ich herzlich für die fortwährende Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Lena Poggenpohl für das Raussuchen von Patientenproben und Tabellen mit klinischen Patientendaten. Bei Frau Dipl Ing. Anastasia Hübener bedanke ich mich außerdem noch für die gute aber leider kurze Schreibtischnachbarschaft.

Meinen geliebten Eltern und meinem Freund danke ich ganz herzlich, dass sie mir privat den nötigen Rückhalt und Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit gegeben haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.