

# Badania asocjacyjne całego genomu w poszukiwaniu markerów odpowiedzi na leczenie u pacjentów przewlekle zakażonych wirusem HCV o genotypie 1

## Whole genome association studies in search of treatment response markers in the patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection

Krzysztof Domagalski<sup>1,2</sup>, Andrzej Tretyn<sup>2</sup>, Małgorzata Pawłowska<sup>1</sup>, Waldemar Halota<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK, Bydgoszcz, Polska

<sup>2</sup> Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK, Toruń, Polska

**Summary:** In the world 170 millions of people are infected with hepatitis C virus (HCV). Current recommended therapy for chronic HCV infection is expensive, can have serious adverse reactions and is unsuccessful in 50 % of genotype 1 cases. At present is not possible to identify individuals who fail to clear the virus on therapy (nonresponders). Both viral and host factors have been implicated in treatment outcome. Here we review recent progress made in the identification of the host determinants associated with HCV treatment response, using genome-wide association studies (GWAS). GWA studies have provided evidence that several SNPs from the region *IL-28B* gene are significantly associated with response to standard of care therapy.

**Słowa kluczowe:** przewlekłe zapalenie wątroby typu C • odpowiedź na leczenie • polimorfizm pojedynczego nukleotydu • badanie asocjacyjne całego genomu

**Key words:** chronic hepatitis C • treatment response • polymorphism • single nucleotide • genome-wide association study

**Adres do korespondencji:** Krzysztof Domagalski, Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK, ul. Floriana 12, 85-838 Bydgoszcz, Polska, e-mail: kikchzak@cm.umk.pl

### Wstęp

Infekcje wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) są jedną z epidemii XXI wieku. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) około 170 milionów ludzi na świecie jest zakażonych wirusem HCV. W Polsce liczba zakażonych HCV wynosi około 730 tys. [1]. Przewlekłe zapalenie wątroby typu C (pzw C) dotyczące 80% przypadków, powoduje stopniowe uszkodzenie wątroby, które u 20–25% pacjentów prowadzi ostatecznie do marskości tego narządu, a także raka wątrobowo-komórkowego (ang. hepatocellular carcinoma; HCC). Następstwa te stanowią główną przyczynę transplantacji wątroby.

Zasadniczym celem leczenia zakażeń HCV jest osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej SVR (definiowanej

jako niewykrywalność wirerii 24 tygodnie po zakończeniu leczenia), przy zastosowaniu terapii jak najmniej obciążającej pacjenta. Leczenie pzw C oparte na terapii skojarzonej pegylowanym interferonem alfa (pIFN) i rybawiryną (RBV) jest obecnie standardem stosowanym na całym świecie [1,2]. Mimo stosowania od kilkunastu lat terapii przeciwwirusowej pzw C, jej optymalizacji i indywidualizacji, średnio około połowa pacjentów nie uzyskuje trwałej odpowiedzi wirusologicznej na leczenie. Stosowana terapia skojarzona pIFN i RBV jest obciążona dużą ilością działań niepożądanych o różnym charakterze i nasileniu. Dlatego prowadzi się badania mające na celu optymalizację standardowego leczenia tak aby mogło ono być dostosowane do potrzeb każdego pacjenta, dąży się do personalizacji leczenia pzw C. W tym kontekście jak i z ekonomicznego punktu widzenia istotna

staje się możliwość przewidywania efektów terapii przed jej rozpoczęciem.

### Czynniki prognostyczne

Przewlekłe zapalenie wątroby typu C jest chorobą, w której określono wiele czynników prognostycznych skuteczności terapii zależnych zarówno od wirusa jak i gospodarza [3,4]. Wśród nich największą rolę odgrywa genotyp HCV, wysokość wyjściowej wirēmii, wydolność układu immunologicznego osoby zakażonej oraz stopień zaawansowania choroby (obecność włóknienia i marskości). Jednym z najważniejszych czynników wirusowych jest genotyp HCV. W Polsce najczęściej występują zakażenia genotypem 1, rzadziej 3, sporadycznie stwierdza się przypadki zakażeń genotypami 2 i 4 [1,5]. Skuteczność leczenia chorych zakażonych genotypem 2, 3 HCV wynosi prawie 90% zaś w przypadku genotypu 1 i 4 HCV około 50%. Oprócz genotypu HCV duże znaczenie w prognozowaniu skuteczności terapii ma wysokość wirēmii HCV przed leczeniem. Znacznie lepiej odpowiadają pacjenci z niższą wirėmią wyjściową (poniżej 400 000 IU/mL). Wśród czynników zależnych od gospodarza wymienia się rasę, wiek, płeć, BMI, oporność na insulinę oraz odpowiedź w 4 a następnie 12 tygodniu leczenia, określane odpowiednio jako szybka (RVR – rapid viral response) i wczesna odpowiedź wirusologiczna (early viral response; EVR). Ważnym czynnikiem jest także „adherencja” pacjentów oraz stopień zaawansowania choroby [3,4].

Aktualne wyniki leczenia wskazują na potrzebę określenia dodatkowych niezależnych czynników o znaczeniu prognostycznym. Podłożem zróżnicowanej odpowiedzi na terapię interferonową są pierwotne właściwości genetyczne komórek układu immunologicznego jak i hepatocytów. Dodatkowo, trudności w leczeniu pzw C związane są ze zmienioną aktywnością genów i białek zainfekowanych komórek, wywołaną oddziaływaniem protein HCV na aparat komórkowy gospodarza. Należą do nich głównie geny odpowiedzi na interferon (ang. interferon-stimulated genes; ISGs) [6].

### Badanie GWAS

Zsekwencjonowanie genomu ludzkiego i rozwój technik biologii molekularnej w tym analiz mikromacierzowych umożliwia prowadzenie badań na poziomie całego genomu. Od kilku lat w przypadku chorych na pzw C znajdują one zastosowanie w poszukiwaniu czynników prognostycznych odpowiedzi na zastosowane leczenie na podstawie określania profilu ekspresji genów komórek wątrobowych bądź jednonajdrzastych krwi obwodowej [7–9]. Z badań w grupie osób z pzw C prowadzonych w ostatnich latach wynika, że czynników prognostycznych możemy szukać badając polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism; SNP) [10–12]. Warianty genetyczne spowodowane zamianą pojedynczego nukleotydu są odpowiedzialne za 90% międzyosobniczej zmienności genomu człowieka i mogą wpływać na zmienność fenotypową [13].

Technika, która umożliwia równoczesną identyfikacji setek tysięcy polimorfizmów SNP oraz określenie ich związku z daną cechą nazywana jest badaniem asocjacyjnym całego genomu (ang. genome-wide association study; GWAS). Oparta jest ona na technologiach płytek mikromacierzowych zawierających sekwencje mające na celu wykrycie znanych SNP z całego genomu, które funkcjonują jako markery

genetyczne [14–16]. Badanie GWAS umożliwia odnalezienie markerów genetycznych danej cechy poprzez stwierdzenie istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania jego polimorficznych wariantów (alleli) w genomach dwóch grup różniących się pod względem badanej cechy. Allele takie mogą być umiejscowione zarówno w sekwencjach kodujących genów potencjalnie związanych z daną cechą jak też poza nimi w przestrzeni między genowej.

### Genetyczne markery skuteczności terapii w pzw C

W 2009 roku opublikowano wyniki niezależnych badań GWAS, których celem było poszukiwanie miejsc genomu człowieka mających wpływ na skuteczności leczenia u chorych na pzw C [17–21]. Temat ten był już wcześniej podejmowany w licznych publikacjach, niemniej jednak badania te były ograniczone do analiz zmienności genów zaangażowanych w procesy odpowiedzi organizmu na zakażenie wirusowe [10–12]. Po raz pierwszy wykorzystano badania GWAS u chorych na pzw C do wykrycia markerów genetycznych w postaci SNP związanych ze skutecznością obecnie stosowanego leczenia. Niezależne zespoły badawcze zgodnie wykazały, że na chromosomie 19 człowieka w obrębie genu *IL-28B*, kodującego jedno z białek interferonów typu lambda oznaczone jako IFN-λ-3, znajdują się markery genetyczne powiązane ze skutecznością leczenia. Wśród nich najważniejsze wydają się być rs12979860 oraz rs8099917. Markery te wyodrębniono poprzez porównanie różnic częstości występowania ich wariantów nukleotydowych w dwóch grupach chorych na pzw C różniących się wynikiem leczenia mierzonym przez SVR. Badaniem zostali objęci pacjenci zakażeni genotypem 1 HCV poddani standardowej terapii. Każde z tych badań było przeprowadzone w różnych grupach etnicznych: Europejczyków, Afroamerykanów, Australijczyków i Japończyków.

#### rs12979860

Ge i wsp. przeprowadzili badania z udziałem 1137 pacjentów należących do trzech grupach etnicznych obejmujących Amerykanów pochodzenia europejskiego, afrykańskiego oraz Hiszpanów, w których zidentyfikowano marker genetyczny rs12979860 opisujący polimorfizm SNP (T/C) położony 3 tysiące par zasad powyżej genu *IL-28B*. W niezależnych analizach w obrębie każdej podgrupy jak i w analizie zbiorczej wykazano istotny statystycznie związek tego markera genetycznego z SVR. Pacjenci o genotypie CC ponad dwukrotnie częściej uzyskiwali SVR w stosunku do chorych o genotypie T/T [17]. W innym badaniu przeprowadzonym w grupie ok. 1 tysiąca pacjentów pochodzących z 6 niezależnych grup wykazano, że polimorfizm rs12979860 jest istotnie statystycznie związany ze spontaniczną eliminacją zakażenia HCV [18]. Wykazano, że częstotliwość występowania allelu C w stosunku do T była znacznie większa w grupie pacjentów eliminujących zakażenie w stosunku do chorych na pzwC, niezależnie od grupy etnicznej. Analizy statystyczne ujawniły, że pacjenci o genotypie C/C mają trzykrotnie większe szanse spontanicznej eliminacji HCV w porównaniu do pacjentów o genotypach CT lub TT bez względu na grupę etniczną, co zdaniem autorów wskazywać może na recesywność tego allelu.

Przeprowadzone przez te dwa zespoły badania populacyjne allelu C rs12979860 ujawniły jego dwukrotnie wyższą częstość występowania u Europejczyków niż u Afrykańczyków



[17,18]. Dodatkowo Thomas i wsp. zależność tą wykazali także w grupie pacjentów, którzy dokonali eliminacji zakażenia HCV [18]. Autorzy zaobserwowali korelacje między częstością występowania allelu C w danych grupach etnicznych a skutecznością terapii jakie prezentują te populacje. W grupach wykazujących większą frekwencję występowania allelu C obserwuje się wyższą skuteczność leczenia. Według autorów rozkład występowania rs12979860 mógłby wyjaśniać znaczące różnice w skuteczności leczenia jakie występują między poszczególnymi grupami etnicznymi [17,18]. Wykazano także, że ochronny wpływ allelu C jest niezależny od współzakażenia wirusem HIV lub HBV oraz innych znanych czynników zależnych od gospodarza [18].

Sekwencjonowanie genu *IL 28B* u wybranych 96 pacjentów pozwoliło na identyfikację dwóch innych SNP silnie sprzężonych z występowaniem markera rs12979860 tj.: rs28416183 oraz rs8103142 [17]. Zależność silnej nierównowagi sprzężeń między rs12979860 a rs8103142 została także opisana w badaniach Thomas i wsp. [18]. Autorom obu prac nie udało się wykazać związku współwystępowania tych SNP z wynikami SVR lub eliminacją zakażenia. Jeden z autorów wskazuje, że polimorfizm rs8103142, którego wystąpienie powoduje powstanie białka o zmienionej sekwencji aminokwasowej (K70R) może wyjaśniać związek markera rs12979860 z lepszym rokowaniem. Niemniej jednak do ustalenia tej zależności niezbędne są badania mające na celu określenie mechanizmów biologicznych odpowiedzialnych za ten związek.

### rs 8099917

Trzy niezależne badania wykazały związek występowania w pobliżu genu *IL28B* niekorzystnego polimorfizmu SNP (allelu G) w rs 8099917 z niepowodzeniem terapii [19-21]. We wstępnych badaniach GWAS przeprowadzonych wśród 314 Japończyków wykryto dwa polimorfizmy SNP, których niekorzystne allele były znacząco częściej obserwowane wśród pacjentów z całkowitym brakiem odpowiedzi na terapię (ang. null virological response; NVR) w stosunku do tych, którzy zareagowali na leczenie (ang. viral response; VR) [19]. Istotność statystyczna dla rs12980275 wynosiła  $P=1.93 \times 10^{-13}$  a dla rs8099917  $3.11 \times 10^{-15}$ . Związek ten potwierdzono w niezależnej grupie badawczej 172 pacjentów, przy czym dla rs12980275 istotność była już mniej znamienne. Co ciekawe pacjenci homozygotyczni pod względem wystąpienia omawianych SNP obserwowani byli tylko w grupie NVR. Asocjacja tych markerów z SVR także okazała się być istotna statystycznie i wynosiła dla rs12980275  $P=3.99 \times 10^{-24}$ , a dla rs8099917  $P=1.11 \times 10^{-27}$ . Badania przeprowadzone w populacji 293 Australijczyków z niezależną grupą walidacyjną 555 potwierdziły znaczenie markera rs8099917, dla którego wykazano największy istotnie statystycznie związek z SVR (dla całej grupy  $P=9.25 \times 10^{-9}$ ) [20]. Z kolei w badaniach Rauch i wsp. w grupie 1015 pacjentów z pzw C oraz 347 z samoistną eliminacją zakażenia HCV wykazali, że allel G rs8099917 jest związany nie tylko z brakiem odpowiedzi na terapię ( $P=3.11 \times 10^{-8}$ ) ale także z chronicznością zakażenia HCV ( $P=6.07 \times 10^{-9}$ ) [21]. Określono, że częstotliwość wystąpienia allelu G u pacjentów z samoistną eliminacją wynosi 24%, dla osób przewlekłe zarażonych którzy odpowiedzieli na terapię 32% zaś dla tych którzy nie odpowiedzieli aż 58%.

Mapowania regionu obejmującego gen *IL-28B* ujawniły obecność w tym miejscu kilkunastu SNP [19,20]. W pracy pod

kierunkiem Tanaka i wsp. w niezależnej grupie 172 pacjentów po dodatkowych analizach tego regionu wyznaczono pulę 7 SNP jako najsilniej istotnie statystycznie związanych z NVR (rs8105790, rs11881222, rs8103142, rs28416813, rs4803219, rs8099917 i rs7248668;  $P=5.52 \times 10^{-28}$ ) –  $2.68 \times 10^{-32}$ ;  $OR=22.3-27.1$ ) [19]. W drugim badaniu wykazano, że obecność allelu C rs8099917 wiąże się z występowaniem haplotypu złożonego łącznie z 6 SNP, który jest znacząco statystycznie częściej spotykany u chorych nie odpowiadających na leczenie [20]. Za pomocą technik ilościowego RT-PCR wykazano, że pacjenci noszący niekorzystny allel G w rs8099917 wykazują obniżoną ekspresję genu *IL-28A* [20] i *IL-28B* [19,20]. Sugeruje się że polimorfizm ten może regulować ekspresję *IL-28B* i w ten sposób wpływać na sukces odpowiedzi terapeutycznej.

### IL 28B

Wyniki powyższych badań podkreślają znaczenie *IL 28B* w prognozowaniu leczenia chorych na pzw C, choć wyznaczone warianty genetyczne nie wpływają w oczywisty sposób na funkcjonowanie tego genu. *IL-28B* razem z *IL-28A* i *IL-29* zlokalizowany jest na chromosomie 19 w miejscu 19q13.13 i należy do genów kodujących interferony lambda. Jest to grupa interferonów, która działając przez własne receptory bierze udział w aktywacji szlaków transdukcji sygnału JAK-STAT odpowiedzialnych za stymulowanie genów odpowiedzi na interferon w infekcji wirusowej. W badaniach *in vitro* udowodniono, że interferony lambda stymulowane są przez infekcję wirusową oraz wykazują działanie przeciwwirusowe podobne do interferonów alfa [22,23]. W zakażeniu HCV wykazano że obecność produktu genu *IL-29* wzmacnia przeciwwirusowe działanie interferonu alfa przez co białko to stanowi potencjalny cel w tworzeniu nowych terapii w pzw C [24,25].

### PCR-RFLP jako metoda detekcji SNP w praktyce laboratoryjnej

Metody biologii molekularnej bardzo szybko znalazły zastosowanie w szeroko rozumianej diagnostyce medycznej. W przypadku chorób zakaźnych ich stosowanie w testach analitycznych staje się wręcz nieodzowne. Korzystanie z wyodrębnionych genetycznych czynników prognostycznych wymaga wprowadzenia diagnostyki molekularnej do praktyki medycznej. Do oznaczania genotypu najczęściej wykorzystuje się metodę polimerazowej reakcji łańcuchowej (ang. polymerase chain reaction; PCR) w połączeniu z metodą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism; RFLP) [26, 27]. Analiza SNP umożliwia zidentyfikowanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w obrębie badanej sekwencji. W praktyce polega to na amplifikacji określonego fragmentu genomu w reakcji PCR przy zastosowaniu starterów okalających badane miejsce polimorficzne. Znajomość sekwencji nukleotydowej powielanego odcinka jest niezbędna dla przeprowadzenia PCR-RFLP. W następnym etapie namnożony fragment poddaje się trawieniu enzymatycznemu, odpowiednio dobraną do sekwencji badanego miejsca polimorficznego endonukleazą restrykcyjną. W przypadku wystąpienia polimorfizmu sekwencja zostanie przecięta i powstają dwie krótsze nici, które można zaobserwować za pomocą technik elektroforetycznych. Zaletą tej techniki jest wysoka wydajność identyfikacji polimorfizmu w obrębie badanej sekwencji, prostota, szybka detekcja, wadą jest póki co stosunkowo wysoki koszt analizy.

## Podsumowanie

GWAS w odróżnieniu od wcześniejszych badań poszukujących związków między polimorfizmami SNP a wynikami leczenia, nie ogranicza się do analiz genów kandydujących lecz odnosi się do całego genomu, dzięki czemu umożliwia uzyskanie całkowicie nowych informacji. Omówione powyżej wyniki badań, istotnie potwierdzają znaczenie genu *IL-28B* w zakażeniu HCV a jednocześnie znaczenie zmienności genetycznej człowieka w chorobach zakaźnych. GWAS ujawnia istnienie pewnych zależności, nie umożliwia jednak badania mechanizmów molekularnych jakie odpowiadają za ich występowanie. Poznanie ich może przyczynić się do opracowywania nowych strategii terapeutycznych, które obecnie

w przypadku interferonów lambda są w trakcie badań (IL-29) [25]. W przypadku wprowadzenia nowych rozwiązań terapeutycznych, pomocna okaże się możliwość opracowania genetycznego testu predykcyjnego, który umożliwiłby u danego pacjenta ustalenie szans odpowiedzi na określone leczenie a tym samym kwalifikację do odpowiedniego dla niego typu leczenia. Sprzyja temu niewątpliwie postęp diagnostyki molekularnej, który w obecnym czasie umożliwia już badanie niewielkiej ilości polimorfizmów w praktyce laboratoryjnej. W miarę jak w nasza wiedza o genomie człowieka i jego zmienności będzie się rozszerzać coraz bardziej realna stanie się wizja personalizacji medycznej czyli praktyki w której każdy pacjent otrzyma leczenie najbardziej optymalne dla niego w oparciu o jego genetyczne właściwości.

## Piśmiennictwo:

1. Standardy leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C. Przegląd Epidemiologiczny, 2009; 73-77
2. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML i wsp.: Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. [errata opublikowana w: N Engl J Med, 2009; 361(10): 1027]. N Engl J Med., 2009; 361(6): 580-93
3. Yamada G, Iino S, Okuno T i wsp.: Virological response in patients with hepatitis C virus genotype 1b and a high viral load: impact of peginterferon-alpha-2a plus ribavirin dose reductions and host-related factors. Clin Drug Investig, 2008; 28(1): 9-16
4. Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S i wsp.: Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. Hepatology, 2008; 48: 1753-60
5. Brojer E, Gronowska A, Medyńska J i wsp.: The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. Transfusion, 2004; 1706-10
6. Tai AW, Chung RT: Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response J Hepatol, 2009; 50: 412-42
7. Seizner N, Chen L, Borozan I i wsp.: Hepatic gene expression and prediction of therapy response in chronic hepatitis C patients. J Hepatol, 2008; 48: 708-13
8. Chen L, Borozan I, Feld JJ i wsp.: Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. Gastroenterology, 2005; 128: 1437-44
9. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L i wsp.: Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy. J Virol, 2007; 81: 3391-401
10. Su X, Yee LJ, Im K i wsp.: Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. J Hepatol, 2008; 49(2): 184-91
11. Morgan TR, Lambrecht RW, Bonkovsky HL i wsp.: DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: results from the HALT-C trial. J Hepatol, 2008; 49(4): 548-56
12. Welzel TM, Morgan TR, Bonkovsky HL i wsp.: Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-Alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. Hepatology, 2009; 49(6): 1847-58
13. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res, 1998; 8(12): 1229-31
14. Maresso K, Broeckel U: Genotyping platforms for mass-throughput genotyping with SNPs, including human genome-wide scans. Adv Genet, 2008; 60: 107-39
15. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G i wsp.: Genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. Nat. Genet, 2005; 37: 549-54
16. Matsuzaki H, Dong S, Loi H i wsp.: Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. Nat Methods, 2004; 1(2): 109-11
17. Ge D, Fellay J, Thompson AJ i wsp.: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature, 2009; 461: 399-401
18. Thomas DL, Thio CL, Martin MP i wsp.: Genetic variation in IL28B and to spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature, 2009; 461: 798-801
19. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M i wsp.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet, 2009; 41: 1105-9
20. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G i wsp.: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet, 2009; 41: 1100-4
21. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P i wsp.: Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology, 2010; 138: 1338-45
22. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W i wsp.: IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol, 2003; 4: 63-68
23. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV i wsp.: IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol, 2003; 4(1): 69-77
24. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G i wsp.: Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. Gastroenterology, 2006; 131: 1887-98
25. Miller DM, Klucher KM, Freeman JA i wsp.: Interferon Lambda as a Potential New Therapeutic for Hepatitis C. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009; 1182(1): 80-87
26. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M: Restriction enzyme analysis of PCR products. Methods Mol Biol, 2009; 578: 405-14
27. Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H: Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Nat Protoc, 2007; 2(11): 2857-64

