

**Einfluss der Einzelnukleotidpolymorphismen *DDX5* und *TRAF1* auf die  
Leberfibrose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Anne-Sophie Knipper**  
aus Hamburg

2013

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Lammert  
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.10.2013

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Bonn  
ehem. Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch  
amtierender Direktor: Prof. Dr. C. Strassburg

## **Meinen Eltern**



## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                  | <b>7</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1 Epidemiologie der Leberfibrose .....                            | 9         |
| 1.2 Pathogenese der Leberfibrose.....                               | 11        |
| 1.3 Diagnostik der Leberfibrose .....                               | 14        |
| 1.4 Progressionsfaktoren der Leberfibrose .....                     | 18        |
| 1.5 Assoziationsuntersuchungen .....                                | 18        |
| 1.6 Einzelnukleotidpolymorphismen.....                              | 19        |
| 1.6.1 <i>DDX5</i> .....   | 20        |
| 1.6.2 <i>TRAF1</i> .....  | 20        |
| 1.7 Fragestellung .....   | 23        |
| <b>2. Patienten und Methoden .....</b>                              | <b>24</b> |
| 2.1 Patientenkollektiv .....  | 24        |
| 2.2 DNA-Extraktion und -Aufbereitung.....                           | 24        |
| 2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA .....           | 25        |
| 2.4 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR).....            | 25        |
| 2.4.1 Genotypisierung der <i>TRAF1</i> - und <i>DDX5</i> -SNPs..... | 26        |
| 2.5 Bestimmung des Leberfibrosestadiums.....                        | 29        |
| 2.5.1 Transiente Elastographie.....                                 | 29        |
| 2.5.2 Leberbiopsie.....   | 30        |
| 2.6 Statistische Verfahren.....                                     | 30        |
| 2.7 Labormaterialien und Geräte .....                               | 31        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>  | <b>32</b> |
| 3.1 Patientenkollektiv .....  | 32        |
| 3.2 Leberfibrose.....   | 34        |
| 3.3 Genotypisierung des <i>DDX5</i> -SNP .....                      | 38        |
| 3.4 Genotypisierung des <i>TRAF1</i> -SNP.....                      | 39        |
| 3.5 Hardy-Weinberg-Äquilibrium .....                                | 40        |
| 3.6 Assoziationsstudie zu <i>DDX5</i> .....                         | 43        |
| 3.6.1 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv.....     | 43        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Kollektiv der HCV-Patienten .....        | 45        |
| 3.7 Assoziationsstudie zu <i>TRAF1</i> .....  | 48        |
| 3.7.1 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv.....                     | 48        |
| 3.7.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Kollektiv der HCV-Patienten .....        | 52        |
| 3.7.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv ohne HCV-Patienten ..... | 55        |
| 3.8 Regressionsanalysen.....  | 59        |
| <b>4. Diskussion .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>7. Danksagung .....</b>  | <b>75</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| Anti-HBc           | Anti-Hepatitis B core protein  |
| ARFI               | Acoustic radiation force impulse imaging   |
| BMI                | Body mass index  |
| CD                 | Cluster of differentiation   |
| $\gamma$ -GT       | Gamma-Glutamyltransferase  |
| CTGF               | Connective tissue growth factor  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat   |
| Et al.             | Et alii (und andere)   |
| DDX5               | DEAD (Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat)-Box-(DDX)-Proteine                      |
| DNA                | Desoxyribonucleic acid   |
| ET                 | Endothelin   |
| EGF                | Epidermal growth factor  |
| ET1                | Endothelin 1   |
| FRET               | Fluorescence resonance energy transfer   |
| FGF                | Fibroblast growth factor   |
| HBV                | Hepatitis B Virus  |
| HCl                | Hydrogenchlorid  |
| HCV                | Hepatitis C Virus  |
| HIV                | Human immunodeficiency virus   |
| ICD                | International statistical classification of diseases and related health problems |
| IQR                | Interquartile range  |
| KHCO <sub>3</sub>  | Kaliumhydrogencarbonat   |
| kPa                | kilopascal   |
| Mio.               | Millionen  |
| MMP                | Matrix-Metalloproteinase   |
| NaCl               | Natriumchlorid   |
| NADPH              | Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrogenase                                  |
| NF- $\kappa$ B     | Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B   |
| NH <sub>4</sub> Cl | Ammoniumchlorid  |
| NO                 | Stickstoffmonoxid  |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| PBC           | Primär biliäre Zirrhose               |
| PCR           | Polymerase chain reaction             |
| PDGF          | Platelet derived growth factor        |
| rpm           | Revolutions per minute                |
| SNP           | Single nucleotide polymorphism        |
| TGF           | Transforming growth factor            |
| TIMP          | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| TLR           | Toll-like receptor                    |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$          |
| TRAF          | TNF-receptor-associated factors       |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor    |

## **1. Einleitung**

Die Leberfibrose, die Vernarbung des Lebergewebes, ist - unabhängig von der Ätiologie - die gemeinsame Endstrecke aller chronischen Lebererkrankungen (Siegmund et al., 2005). Sie führt schließlich zur Leberzirrhose und kann in ein hepatozelluläres Karzinom oder ein chronisches Leberversagen münden.

### **1.1 Epidemiologie der Leberfibrose**

Die Leberfibrose ist als Vorläufer der Zirrhose und somit als Endstadium aller chronischen Lebererkrankungen sowohl von großer klinischer als auch gesundheitsökonomischer Relevanz. Laut Schätzungen des Bundesgesundheitsministeriums sind 4 bis 5 Millionen Menschen in Deutschland von einer Lebererkrankung betroffen (Gesundheitsbericht für Deutschland, 1998). Die chronischen Leberkrankheiten umfassen eine große Bandbreite von Leberveränderungen mit unterschiedlichen Ursachen und Verläufen, die per definitionem für mindestens 6 Monate anhalten müssen. In Deutschland entsteht die Leberzirrhose als Endpunkt aller chronischen Lebererkrankungen in 50 % der Fälle auf dem Boden übermäßigen Alkoholkonsums (Renz-Polster et al., 2004). Nach Angaben des Gesundheitsberichtes für Deutschland wird die Zahl der Erwachsenen mit alkoholbedingter Leberkrankheit auf 2 bis 3 Mio. Menschen geschätzt. Davon sind etwa 0,6 bis 1,0 Mio. Menschen von einer Alkoholhepatitis bzw. -zirrhose betroffen (Statistisches Bundesamt, 2010). Die zweithäufigste Ursache sind chronische Virusinfektionen (40-50 %), insbesondere die chronische Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion. Daneben können weitere, teilweise sehr seltene Krankheiten wie Autoimmunprozesse oder Stoffwechselstörungen eine chronische Lebererkrankung zur Folge haben (Pinzani et al., 2011).

Schätzungen zur Verbreitung der chronischen Hepatitis C gehen von einer Seroprävalenz von 0,1 bis 0,4 % aus, die Seroprävalenz für anti-HBc als Indikator einer stattgehabten Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion wird mit 7,0 % angegeben (Thierfelder et al., 2001). Die Gesamtzahl der jährlich gemeldeten Neuerkrankungen an HBV- und HCV-Neuinfektionen ist in Deutschland seit einigen Jahren leicht rückläufig. 2009 wurden 1.692 Fälle von akuter Hepatitis B an das Robert-Koch-Institut gemeldet; im Jahre 2008 waren es noch 1.852 Fälle. 5.412 Fälle von Hepatitis C wurden 2009 erstdiagnostiziert und gemeldet, während es im Jahr zuvor noch 6.232 Fälle waren (Statistisches Bundesamt, 2010, Robert-Koch-Institut, 2010).

Die Häufigkeit von chronischen Lebererkrankungen wird oft unterschätzt. Im Jahre 2008 wurden

49.030 Männer und 32.850 Frauen stationär wegen chronischer Leberkrankheit und -zirrhose (ICD-10 Diagnosen K70-77) behandelt. Im Vergleich dazu wurden 2008 95.308 Patienten aufgrund des häufigen Kolonkarzinoms stationär versorgt (Statistisches Bundesamt, 2010). Außerdem haben Patienten, die an einer chronischen Lebererkrankung leiden, eine deutlich erniedrigte Lebenserwartung. Das durchschnittliche Sterbealter der Patienten lag 2008 bei 64,2 Jahren, wobei die durchschnittliche Lebenserwartung eines neugeborenen Jungen 2008 77,2 Jahre und für neugeborene Mädchen 82,4 Jahre betrug (Statistisches Bundesamt, 2010). Jedes Jahr versterben in Deutschland etwa 15.000 Menschen an einer Lebererkrankung (Statistisches Bundesamt, 2010). Das entspricht einer Sterberate von 19/100.000 Einwohner. Im Vergleich hierzu starben 2009 17.501 Patienten an einer bösartigen Neubildung des Dickdarms, das entspricht einer Mortalität von etwa 21/100.000 Einwohner (Statistisches Bundesamt, 2010).

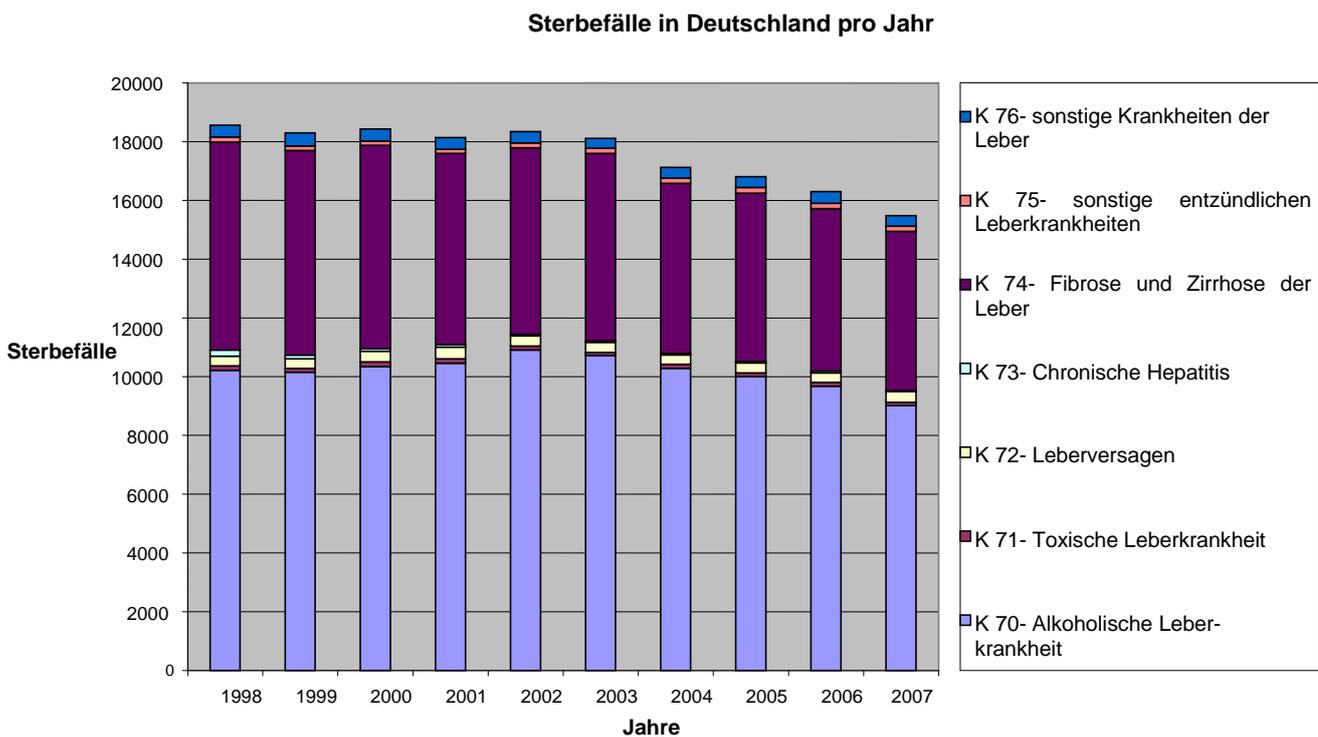


Abb. 1: Sterbefälle in Deutschland von 1998 bis 2007, ICD-10 Diagnosen K70-K76 (Statistisches Bundesamt, 2010)

Anhand dieser Daten lässt sich deutlich sehen, dass die Leberfibrose als Vorläufer der Zirrhose und damit als Endstadium aller chronischen Leberkrankheiten unabhängig von ihrer Ätiologie erhebliche klinische und gesundheitsökonomische Relevanz besitzt.

## 1.2 Pathogenese der Leberfibrose

Die Leberfibrose ist die Antwort der Leber auf eine chronische Schädigung und ähnelt grundsätzlich den Mechanismen der Wundheilung (Knittel et al., 1998). Die histologisch gesunde Leber besteht aus einer epithelialen Komponente (Hepatozyten), einer endothelialen Auskleidung (diese zeichnet sich durch eine Fenestrierung aus), Gewebemakrophagen (Kupffer-Zellen) und den perivaskulär liegenden mesenchymalen Sternzellen (auch Ito-Zellen genannt), die etwa 15 % der residenten Leberzellen ausmachen. Die zellulären Elemente sind in Sinusoiden organisiert, in denen der subendotheliale Disse-Raum das Epithelium (Hepatozyten) vom sinusoidalen Endothelium separiert. Der Disse-Raum enthält eine basalmembranähnliche Matrix (Friedman, 2000).

Nach einer akuten Schädigung (z.B. durch eine virale Hepatitis) regenerieren sich die Parenchymzellen und ersetzen die nekrotischen oder apoptotischen Zellen. Dieser Prozess geht mit einer inflammatorischen Reaktion und einer limitierten Einlagerung von extrazellulärer Matrix einher. Sobald die Schädigung jedoch chronisch wird, versagt dieser Regenerationsprozess der Leber schließlich, und die Hepatozyten werden durch extrazelluläre Matrix, insbesondere fibrilläres Kollagen, ersetzt (Bataller et al., 2005). Im Zentrum dieses fibrogenetischen Prozesses stehen die hepatischen Sternzellen, die im parasinusoidalen Raum lokalisiert sind. In ihrer ruhenden Form speichern sie Vitamin A und tragen nur unwesentlich zur Produktion der extrazellulären Matrix bei (Török, 2008). In ihrer aktivierten Form jedoch sind die Sternzellen die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix in der geschädigten Leber (Bataller et al., 2005). Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen wird als einer der wesentlichen Schritte in der Pathophysiologie der Fibrogenese angesehen (Friedman, 2008 b; Knittel et al., 1998). Initial kommt es durch Gewebnekrosen zu einer Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems. Die Nekrosen werden durch chronisch schädigende Noxen (z.B. Alkohol) verursacht (Neubauer et al., 1995). Es folgt eine Aktivierung der Kupffer-Zellen. Entzündungszellen, insbesondere Mono- und Granulozyten sowie Thrombozyten werden aus dem Blut rekrutiert. Diese Zellen sezernieren zusammen mit dem sinusoidalen Endothel eine Vielzahl unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine. Dazu gehören der transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), der platelet derived growth factor-1 (PDGF), der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie der epidermal growth factor (EGF). Diese parakrinen Faktoren, freie Sauerstoffradikale aus der Lipidperoxidation und Veränderungen der extrazellulären Matrix induzieren den frühen Wandel in der Genexpression und die phänotypische Änderung der hepatischen Sternzelle, die diese für Zytokine und andere Stimuli empfänglich machen (Knittel et al., 1995). Die erhöhte

Bindegewebsproduktion der Sternzellen kommt nicht nur durch erhöhte Zellanzahl, sondern auch durch erhöhte Produktion jeder einzelnen Zelle zustande. Der größte Bestandteil der vermehrt synthetisierten Matrixproteine (Kollagene, Glykoproteine, Proteoglykane und Glykosaminoglykane) ist Kollagen I. Induziert wird diese Produktion durch TGF- $\beta$  (Tsukada et al., 2006).

Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen führt zu sechs charakteristischen Veränderungen. Es kommt zu vermehrter Proliferation und Chemotaxis sowie erhöhter Fibrogenese und Kontraktilität, einem gestörtem Abbau der extrazellulären Matrix und zum Verlust der Vitamin A-Speicherkapazität (Abb. 2). Die Proliferation der hepatischen Sternzellen wird vor allem vom PDGF getriggert, der über einen PI3-Kinase-/ERK/MAP-Kinase-Weg aktiviert wird (Pinzani und Marra, 2001). Die Kontraktilität der Sternzellen wird von Endothelin-1 sowie einer immer länger werdenden Liste verschiedener anderer Aktivatoren (Angiotensin II, Eicosanoide, ANP, Somatostatin) beeinflusst (Rockey, 2003). Diese veränderte Kontraktilität könnte eine große Rolle beim erhöhten portalen Widerstand im Rahmen der Fibrose spielen (Friedman, 2008 a).

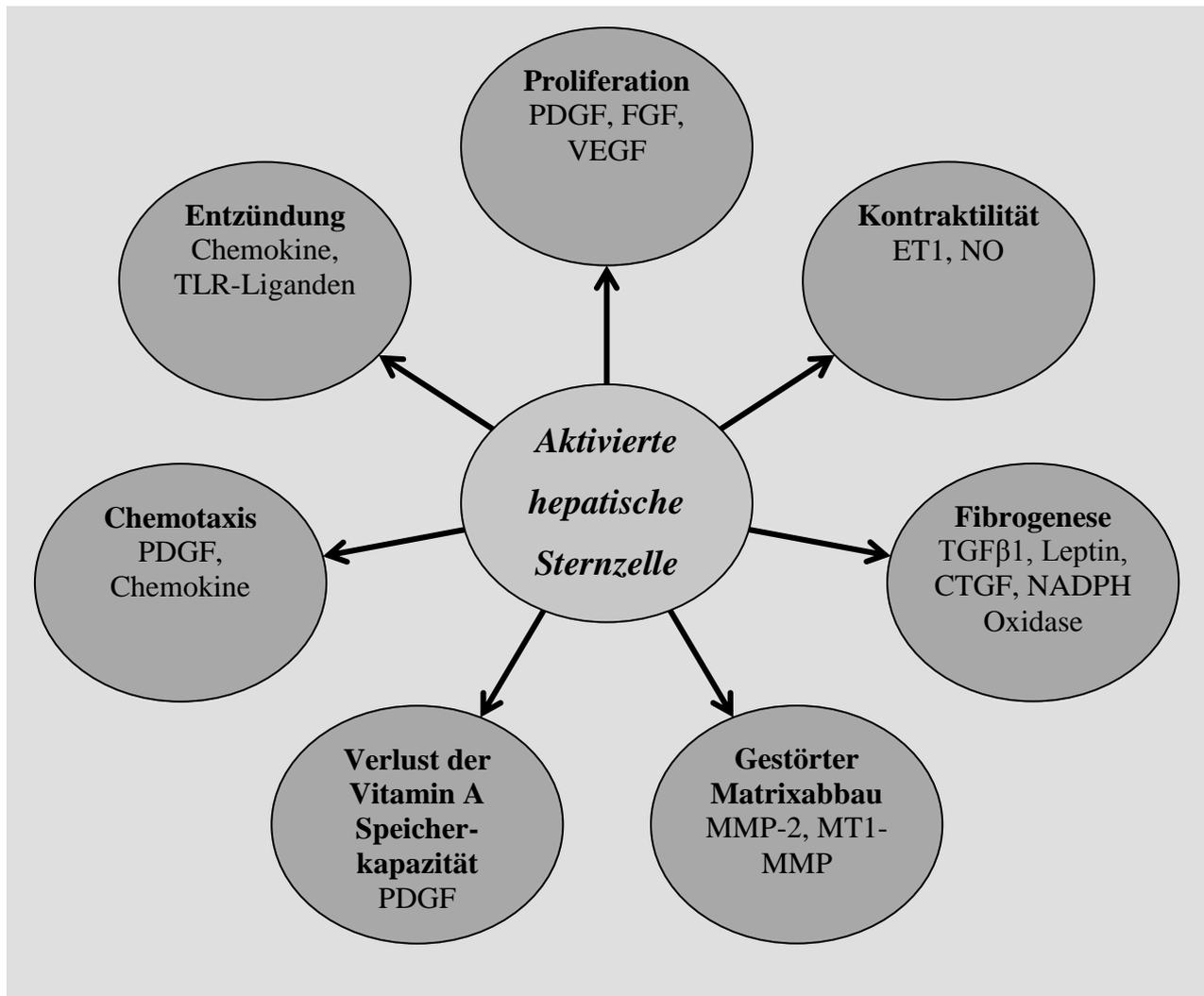


Abb. 2: Phänotypische Hauptveränderungen nach Aktivierung der hepatischen Sternzelle, dargestellt zusammen mit den dafür verantwortlichen Mediatoren (nach Friedman, 2010). PDGF = Platelet Derived Growth Factor, FGF = Fibroblast Growth Factor, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, ET1 = Endothelin 1, NO = Stickstoffmonoxid, TGFβ1 = Transforming Growth Factor-β1, CTGF = Connective Tissue Growth Factor, NADPH = Nicotinamidadeninukleotidphosphat-Hydrogenase, MMP-2 = Matrix-Metalloproteinase 2, MT1-MMP = Membrane Type 1 Metalloprotease, TLR = Toll-like Receptor

Der verminderte Abbau der extrazellulären Matrix verschiebt zusammen mit der erhöhten Bindegewebsproduktion das Gleichgewicht zugunsten der Synthese. In Folge dieses Ungleichgewichts kommt es zur Leberfibrose. Normalerweise wird das Leberbindegewebe durch spezifische Proteasen (Matrix-Metalloproteinasen, auch MMP) abgebaut (Abb. 2). Die Aktivität dieser MMP wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert, u.a. werden die Proteasen durch spezifische Inhibitoren (tissue inhibitors of MMP, TIMP) reguliert. In den hepatischen Sternzellen der fibrotischen Leber sind die MMPs vermindert, und die TIMPs werden verstärkt exprimiert (Friedman,

2008 a; Knittel et al., 1998). Für die veränderte Chemotaxis, die zu einer erhöhten Akkumulation der Sternzellen an Orten der Gewebeschädigung führt, wird neben Monocyte Chemotactic Protein-1 und CD183 insbesondere der PDGF verantwortlich gemacht (Ikeda et al., 1999).

Hieraus kann geschlossen werden, dass die hepatischen Sternzellen als wesentliche Effektorzellen in der Leberfibrogenese anzusehen sind. Neben diesen spielen jedoch auch andere Leberzellen eine Rolle im komplexen fibrogenetischen Prozess: Die Hepatozyten sind Ziel der meisten hepatotoxischen Substanzen, wie z.B. der Hepatitis- Viren, der Alkoholmetaboliten oder der Gallensäuren. Bei Schädigung setzen sie Sauerstoffradikale sowie fibrogenetische Mediatoren frei und induzieren so die Rekrutierung von Entzündungszellen. Die Sternzellen werden aktiviert und sezernieren inflammatorische Zytokine, exprimieren die Zelladhäsionsmoleküle und modulieren die Aktivierung der Lymphozyten. Der so entstandene Circulus vitiosus sorgt dafür, dass sich die inflammatorischen und fibrogenetischen Stimulierungen gegenseitig verstärken (Maher, 2001). Die residenten Lebermakrophagen spielen eine Rolle, indem sie ebenfalls Zytokine und freie Sauerstoffradikale ausschütten. Die Veränderung der Zusammensetzung der Matrix kann direkt die Fibrogenese stimulieren. Insbesondere Typ IV-Kollagen und Fibrinogen stimulieren die residenten Sternzellen, beispielsweise durch die Aktivierung latenter Zytokine wie TGF- $\beta$ 1 (Bataller et al., 2005).

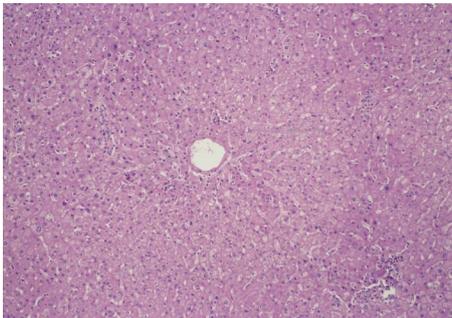
Zusammengefasst ist die Fibrogenese also das Resultat komplexer Interaktionen zwischen hepatischen Zellen, extrazellulären Matrixmakromolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die hepatischen Sternzellen aktivieren und somit zu einer erhöhten Synthese und einer verminderten Degradation der Komponenten der extrazellulären Matrix führen. Diese Ansammlung von Extrazellulärmatrix während der Fibrosierung der Leber zerstört die physiologische Architektur und bedingt den späteren knotigen Umbau im Rahmen der Leberzirrhose (Das und Vasudevan, 2008).

### **1.3 Diagnostik der Leberfibrose**

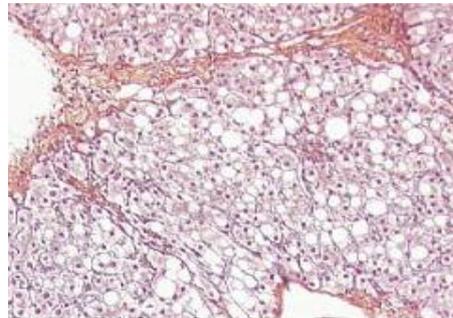
Die Diagnostik einer akuten oder chronischen Lebererkrankung dient der Ursachenabklärung sowie der Suche nach Folgeerkrankungen und möglichen Komplikationen. Das genaue Staging der Leberfibrose hat insofern auch eine große praktische Bedeutung, als dass bei vielen Ätiologien die Indikationsstellung und Intensität der therapeutischen Strategie von dem Fibrorestadium abhängt. Insbesondere angesichts der Nebenwirkungen und Kosten der Therapieverfahren ist eine korrekte Indikationsstellung erforderlich (Bahr, 2009). Zu Beginn der Basisdiagnostik einer Lebererkrankung stehen neben Anamnese und klinischem Bild

verschiedene Laborparameter, mit welchen die Schwere der Krankheit bemessen werden kann, im Vordergrund (Rabe et al., 2001). Stoffwechselstörungen oder Infektionskrankheiten können mit Hilfe spezieller Laboruntersuchungen erkannt werden.

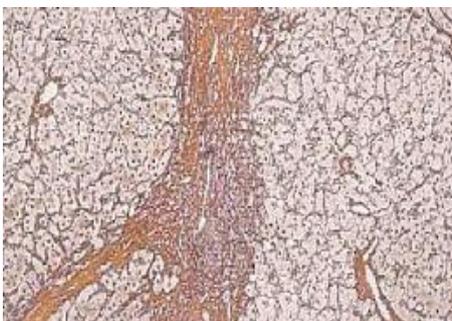
Als Goldstandard der Diagnostik der hepatischen Fibrose gilt nach wie vor die Gewinnung einer Histologie durch die Leberbiopsie (Schirmacher et al., 2004). Diese lässt sich perkutan, bei blutungsgefährdeten Patienten auch transjugulär oder auch unter Sicht (z.B. Minilaparoskopie) gewinnen (Rabe et al., 2001). Histologisch wird das Ausmaß der Fibrose nach etablierten Systemen beurteilt. Es gibt verschiedene Klassifikationssysteme (z.B. nach Desmet und Scheuer, Knodell oder METAVIR) zur Einschätzung des Fibrorestadiums (Wasmuth und Trautwein, 2009). Eines der am häufigsten verwendeten Systeme ist das Staging nach Desmet und Scheuer, das von der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten für die Beurteilung einer Leberfibrose empfohlen wird (Schirmacher et al., 2004). Die Fibrorestadien werden von F0 bis F4 eingeteilt, wobei F0 keine Fibrose bedeutet und F4 das Endstadium, die Zirrhose, kennzeichnet.



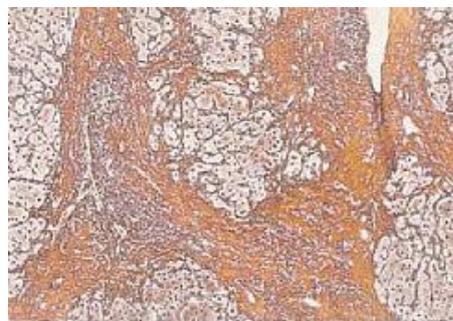
*Normales Lebergewebe*



*Fibrose F1-2*



*Fibrose F3*



*Fibrose F4*

Abb. 3: Histologische Fibrorestadien (Schirmacher et al., 2004). Dargestellt sind histologische Schnitte der Leber, von normalem Lebergewebe bis zur Leberzirrhose (Fibrose F4)

Die Leberpunktion als invasives Testverfahren stellt jedoch für den chronisch erkrankten Patienten ein gewisses Risiko dar. Die Komplikationsrate der Leberbiopsie wird mit 0,8 % bis 13,6 % angegeben (Myers et al., 2008; van der Poorten et al., 2006). Es können Blutungen, Infektionen oder Verletzungen umliegender Organe entstehen. Insbesondere Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose oder Lebertumoren sind von Blutungen bedroht, auch treten diese in 70 % der Fälle erst verspätet ( $> 24$  Stunden nach der Biopsie) auf (Terjung et al., 2003).

Die Aussagekraft der Biopsie bezüglich des histopathologischen Stagings ist stark von der Größe des gewonnenen Materials und der Anzahl erfasster Portalfelder abhängig (Schirmacher et al., 2004). Es kann zu einem so genannten „sampling error“ kommen, d.h. unterschiedlich stark betroffenes Lebergewebe wird biopsiert und untersucht. Auch unterschiedliche Einschätzungen der Pathologie können die Diagnose erschweren. Diese „inter-observer variability“ ist zwar unabhängig von der Größe der Biopsie, kann jedoch in bis zu 20 % der Fälle zu Diskrepanzen bei der Einschätzung des Fibrorestadiums führen (Petz et al., 2003).

Des Weiteren werden zur Diagnose zahlreiche Serummarker herangezogen. Sowohl einzeln als auch in Kombination in Scores sind sie zur Einschätzung des Schweregrades von Lebererkrankungen hilfreich (Lörke et al., 2007). Man unterscheidet direkte von indirekten Serummarkern: Die direkten Marker stehen unmittelbar mit dem Prozess der Fibrogenese in Zusammenhang (z.B. Proteine der extrazellulären Matrix oder Zytokine). Sie reflektieren den Umsatz der extrazellulären Matrix, sind jedoch unspezifisch für die Leber und können auch bei anderen fibrosierenden Erkrankungen erhöht sein (Das und Vasudevan; 2008, Lörke et al., 2007; Wasmuth und Trautwein, 2009). Indirekte Marker spiegeln die Alteration der hepatischen Funktion wider. Beispielsweise kommt es mit zunehmender Leberfibrosierung zu einer verminderten Produktion von Thrombopoetin, was neben dem Hypersplenismus zu einer verminderten Thrombozytenanzahl führt. Mit Hilfe dieser indirekten Marker haben sich verschiedene Scores etabliert. Einer der am häufigsten verwendeten Tests ist der „aspartate aminotransferase to platelet ratio index“ (APRI-Score), der mit Hilfe der Aspartataminotransferase-Aktivität im Serum und der Thrombozytenzahl bestimmt wird. Ein weiterer Score ist der „Fibrotest“, in den verschiedene Parameter ( $\alpha_2$ -Makroglobulin, Haptoglobin, Apolipoprotein A1, Gesamtbilirubin,  $\gamma$ -GT) sowie das Alter und das Geschlecht des Patienten einfließen. Er hat eine vergleichbar hohe Spezifität von 93 % wie der APRI-Score (Spezifität 87 – 93 %), beide Tests haben allerdings nur eine Sensitivität für die Erkennung einer Leberzirrhose von etwa 50 % (Lörke et al., 2007). Die Stärke dieser Scores liegt in der Detektion einer Zirrhose, für eine Unterscheidung der einzelnen Fibrorestadien sind sie jedoch nicht geeignet.

Der bildgebenden Diagnostik kommt eine wichtige Rolle bei der Abklärung chronischer Leberkrankheiten zu. Mit Hilfe von sonographischen und duplexsonographischen Untersuchungen können Pathologien wie Aszites oder Splenomegalie erkannt werden. Computer- und Magnetresonanztomographie dienen dem Ausschluss von Tumoren und Metastasen (Renz-Polzer et al., 2004). Von zunehmender Bedeutung in der Diagnostik der chronischen Lebererkrankungen ist die Elastographie. Dieses nicht-invasive ultraschallgestützte Verfahren basiert auf der Einschätzung der Lebersteifigkeit zur Beurteilung der Leberfibrose. Bei der Elastographie wird mit einer hochfrequenten Ultraschallwelle die Ausbreitung einer niederfrequenten elastischen Welle in der Leber gemessen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit korreliert mit der Steifigkeit (in Kilopascal (kPa)) (Friedrich-Rust und Zeuzem, 2007). Die Untersuchung ist innerhalb kurzer Zeit durchführbar und schmerzlos, beliebig oft wiederholbar und schnell erlernbar. Die Untersuchungsgeräte (Fibroscan<sup>®</sup>) werden zurzeit ausschließlich von Echosens hergestellt. Die Unterscheidung zwischen Leberzirrhose und Nicht-Zirrhose kann sehr zuverlässig erfolgen und sowohl Sensitivität (77-100 %) als auch Spezifität (82-97 %) zur Erkennung einer Zirrhose sind sehr hoch (Lörke et al., 2007). Der optimale cut-off für die Detektion einer Leberzirrhose wurde in einer kürzlich durchgeführten Meta-Analyse mit 13 kPa ermittelt (Friedrich-Rust et al., 2008). Die Differenzierung leichter Fibrosestadien ist mit Fibroscan weniger zuverlässig möglich. Auch ist er bei adipösen Patienten sowie bei Aszites nur begrenzt einsetzbar (Grünhage und Lammert, 2009).

Ein neues Verfahren ist das „Acoustic Radiation Force Impulse“ (ARFI)-Imaging. Hier können mithilfe von akustischen Frequenzen Unterschiede in der Gewebesteifigkeit erkannt werden (Friedrich-Rust et al., 2009). Mittels kurzer akustischer Impulse werden Gewebeverschiebungen induziert, welche mithilfe von Ultraschallwellen detektiert werden. Das ARFI-Imaging wird in ein konventionelles Ultraschallsystem integriert, so dass das Messareal unter sonographischer Kontrolle platziert werden kann (Rizzo et al., 2011).

Des Weiteren wurde die Magnetresonanzelastographie entwickelt. Dieses Verfahren misst nach Aussendung einer pneumatischen oder elektromechanischen Welle die Ausbreitung dieser Wellen durch die Magnetresonanztomographie. Verschiedene Studien belegen die gute Aussagekraft dieses allerdings sehr aufwändigen Verfahrens bezüglich der Einschätzung des Fibrosestadiums (Taouli et al., 2009).

#### **1.4 Progressionsfaktoren der Leberfibrose**

Lebererkrankungen sind in den meisten Fällen multifaktorielle komplexe Krankheiten, die durch vielfältige Interaktionen zwischen genetischen und exogenen Faktoren moduliert werden (Weber et al., 2010). Trotz langjähriger Schädigung der Leber schreitet die Fibrose bei der Mehrheit der Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung aufgrund der immensen Regenerationskapazität der Leber relativ langsam voran. Bei chronischen Leberschädigungen ist in der Regel erst nach 20 - 40 Jahren mit einer Zirrhose als Endstadium der Leberfibrose zu rechnen (Wasmuth und Trautwein, 2009). Die Progression der Leberfibrose zeigt allerdings eine starke interindividuelle Variabilität, so dass „slow fibroser“ und „rapid fibroser“ unterschieden werden. Diese Unterschiede werden auf Alter, Geschlecht und exogene Faktoren, wie Erkrankungsdauer oder zusätzlichem Alkoholkonsum, zurückgeführt. So gelten männliches Geschlecht, ein Alkoholkonsum von mehr als 50 g pro Tag und bei chronischen Hepatitiden ein spätes Infektionsalter (Patienten älter als 40 Jahre) als Risikofaktoren für eine schnelle Progression der Fibrose (Poynard et al., 1997). Adipositas, Diabetes, Dyslipidämien und Koinfektionen sind ebenfalls für den Verlauf von Bedeutung (Huang et al., 2006).

Allerdings spielen auch genetische Komponenten eine Schlüsselrolle bei der Modulation der hepatischen Fibrose (Day C, 2005). Zunächst konnte anhand verschiedener tierexperimenteller Studien, dann mit Hilfe von Fall-Kontroll-Studien und Zwillingsstudien belegt werden, dass genetische Faktoren für die unterschiedliche Fibroseprogression ebenfalls von Bedeutung sind. Daher wurde eine Vielzahl von verschiedenen Studien durchgeführt, um die Relevanz einzelner Gene für die Progression chronischer Lebererkrankungen zu beurteilen (Grünhage und Nattermann, 2010).

#### **1.5 Assoziationsuntersuchungen**

Unter Assoziation versteht man in der Genetik das überzufällig häufige Auftreten eines genetischen Merkmals (z.B. einer Sequenzvariante) in einem Patientenkollektiv im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Zill et al., 2003). Im Gegensatz zu monogenen Erbkrankheiten wie beispielsweise der zystischen Fibrose oder der Hämophilie A, die durch einen genetischen Defekt in einem spezifischen Genlocus verursacht werden, liegen genetisch komplexe Erkrankungen mehrere Genloci zugrunde. Die Folge ist eine geringe Penetranz der Erkrankung, welche - zusammen mit den multiplen Umweltfaktoren - das Auffinden krankheitsassoziiierter Gene erschwert. Für eine Assoziationsanalyse ist dementsprechend die Untersuchung zahlreicher klinischer Proben notwendig, um Allele zu finden, die statistisch mit der Erkrankung oder ihrer

Progression assoziiert sind (Treutlein und Schumann, 2005). Im Rahmen von genomweiten Assoziationsuntersuchungen werden in großen Patientenkohorten genetische Marker, die das gesamte Genom abdecken, mit Phänotypen korreliert (Hardy und Singleton, 2009). Können bestimmte Genotypen eines Markerallels signifikant häufiger in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe beobachtet werden, gilt dieser Marker als mit der Erkrankung assoziiert. Er ist dann - bedingt durch das so genannte „Kopplungsungleichgewicht“ - in der Nähe oder innerhalb eines krankheitsrelevanten Gens lokalisiert. Nach der Generierung genomweiter Rohdaten mithilfe von Hochdurchsatzverfahren (z.B. Microarrays) werden anschließend diese Assoziationsdaten einer Qualitätskontrolle unterzogen. Konnten signifikante Assoziationen festgestellt werden, so werden im weiteren Verlauf neue Patientenkohorten bezüglich der gefundenen Marker genotypisiert, um die Assoziation zu replizieren. Liegt eine echte Assoziation vor, können nach Auswertung der Datensätze krankheitsrelevante Loci identifiziert werden (Weber et al., 2010). Auf diese Art sind bereits Risikogene für verschiedene Krankheiten gefunden worden. So wurde eine häufige genetische Variante im hepatoobiliären Cholesterintransporter *ABCG5/G8* mit der Entstehung von Cholesteringallensteinen assoziiert (Buch et al., 2007). Ein SNP im *PNPLA3*-Gen wurde kürzlich mit der Leberverfettung und inzwischen auch mit der Leberfibrose assoziiert (Romeo et al., 2008; Krawczyk et al., 2010).

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Assoziationen zwischen genetischen Ausprägungen, Entstehung und Progression einer Krankheit bieten kandidatengenbezogene Assoziationsuntersuchungen. Hierbei wird ein in vorherigen Studien identifiziertes Gen, das möglicherweise mit einer Krankheit assoziiert ist, analysiert. Mithilfe eines Fall-Kontroll-Studiendesign kann ermittelt werden, ob sich die vermutete Assoziation zwischen Genlocus und Krankheitsbild bestätigen lässt.

## **1.6 Einzelnukleotidpolymorphismen**

Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) sind die häufigsten genetischen Variationen des menschlichen Genoms, bei denen es zur Substitution eines Nukleotids im DNA-Molekül kommt. Sie treten mit einer Frequenz von etwa 1 SNP pro 1000 Basenpaare auf und können in allen Regionen der DNA gefunden werden. Sie werden für die Vielfältigkeit im menschlichen Phänotyp sowie für die unterschiedliche Suszeptibilität für Noxen und Krankheiten verantwortlich gemacht (Aguillón et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei SNPs untersucht:

- (1) Der SNP p.S480A des *DDX5*-Gens wurde 2006 von Huang et al. (Huang et al., 2006) in einer großen Studie als potentieller Risikofaktor für fortgeschrittene Fibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beschrieben.
- (2) Der SNP rs3761847 des *TRAF1*-Gens wurde 2007 von Plenge et al. (Plenge et al., 2007) als ein Suszeptibilitätsfaktor für die rheumatoide Arthritis identifiziert. Er liegt im Kopplungsungleichgewicht mit einer Variante des Komplementfaktors *C5*, die von Hillebrandt et al. (Hillebrandt et al., 2005) als Risikofaktor für eine schwere hepatische Fibrose bei chronischen Lebererkrankungen angesehen wurde.

### 1.6.1 *DDX5*

DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)-Box-(DDX)-Proteine sind eine Familie von Ribonukleinsäure (RNS)-Helikasen, die in allen Organismen von Bakterien bis zu den Menschen zu finden sind. Sie sind in alle zelluläre Prozesse involviert, in deren Rahmen eine Manipulation der RNS-Struktur, wie z.B. die Transkription, die RNS-Degradation, der RNS-Export, das nukleäre und mitochondriale Splicing sowie die Formation von Ribosomen und Splicisomen, stattfindet (Bates et al., 2005). Von ihren Verteilungsmustern ausgehend wird angenommen, dass einige Mitglieder der DDX-Familie in die Embryogenese, die Spermatogenese und das Zellwachstum involviert sind.

Das *DDX5*-Gen auf Chromosom 17q21 besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Die Exon-Länge variiert zwischen 60 und 706 Basenpaaren, während die Introns zwischen 81 und 1243 Basenpaare lang sind (Rössler et al., 2000). *DDX5* kodiert mehrere Helikasen und das Protein p68, das ein potenter Koaktivator des Tumorsuppressors p53 ist (Bates et al., 2005). Der in dieser Arbeit untersuchte SNP p.S480A mit der Nummer rs1140409 (vormals rs3179861) liegt in dem *DDX5*-Gen. Er bedingt einen Austausch von Serin zu Alanin im Exon 13.

### 1.6.2 *TRAF1*

Der zweite untersuchte SNP mit der Nummer rs3761847 liegt im *TRAF1*-Gen, das sich auf dem Chromosom 9q33-34 befindet. Das dort kodierte Protein ist ein Mitglied der TNF-receptor-associated factors (TRAF)-Familie. Die TRAF-Proteine sind wichtige Mediatoren in der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Potter et al., 2007). Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF) ist als proinflammatorisches Zytokin ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, welcher sowohl bei lokalen als auch systemischen Entzündungen hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten, aber auch von Mastzellen oder Endothelzellen ausgeschüttet wird (Rahman und McFadden, 2006). Der lösliche

Tumornekrosefaktor sTNF wirkt auf zwei Rezeptoren, die er mit Lymphotoxin- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) teilt. Der TNF-Rezeptor 1 und der TNF-Rezeptor 2 aktivieren über verschiedene Zwischenschritte (Abb. 4) letztlich den nukleären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Wicovsky et al., 2009). Dies führt zur Aktivierung von proinflammatorischen und antiapoptotischen Genen. Auch in Abwesenheit der Aktivität von NF- $\kappa$ B kann der TNF-Rezeptor 1 einen intrazellulären apoptoseinduzierenden Komplex bilden, der über die Aktivierung spezifischer Caspasen die Apoptose auslöst (Rahman und McFadden, 2006). Es konnte belegt werden, dass *TRAF1* die Signalkaskade in Richtung des proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Weges beeinflusst (Wicovsky et al., 2009).

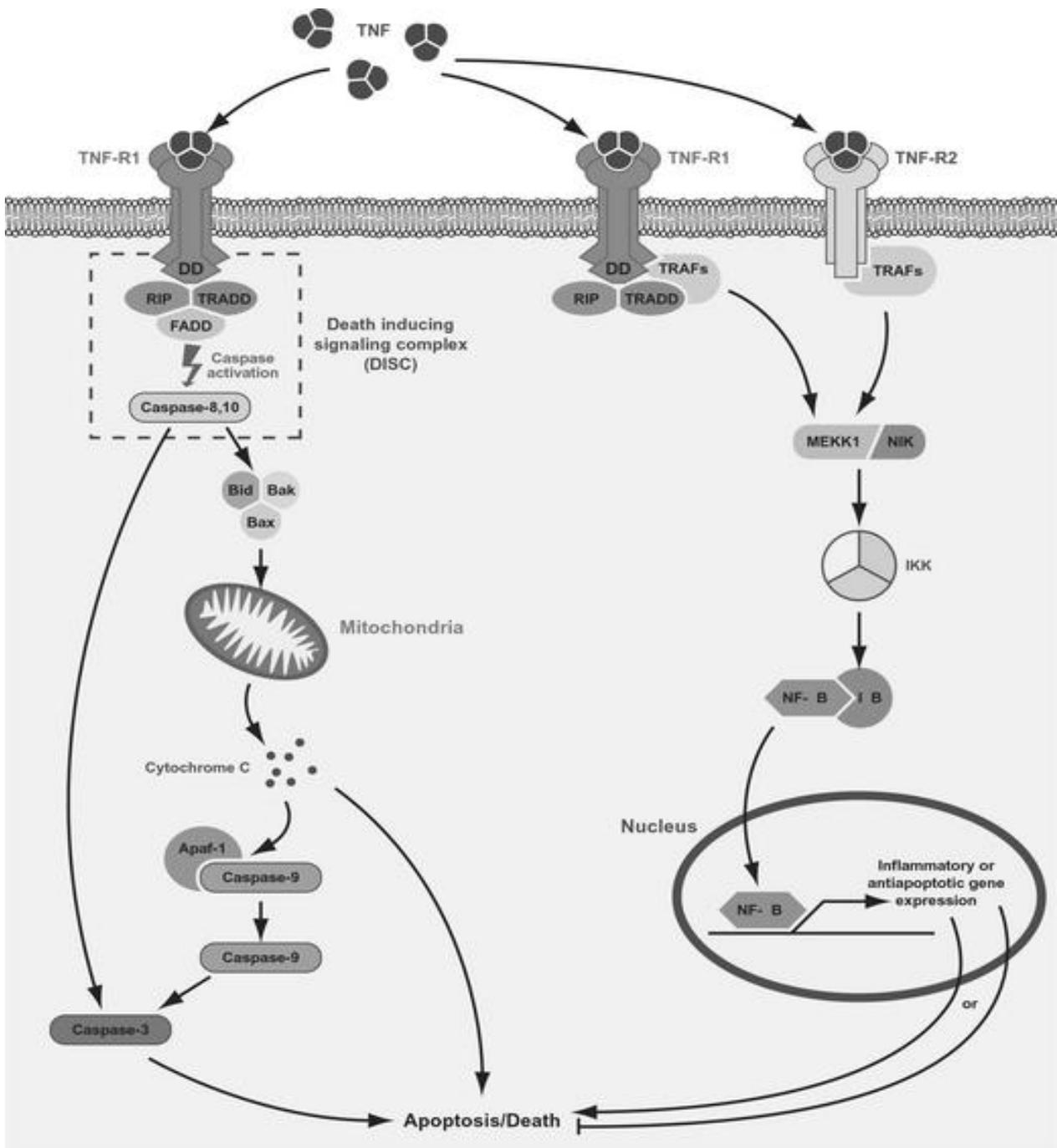


Abb. 4: Signalkaskade des Tumornekrosefaktors (aus Rahman und McFadden 2006, mit freundlicher Genehmigung von Prof. McFadden, University of Florida, USA)

Das *TRAF1*-Gen liegt in enger Nachbarschaft zum *C5*-Lokus, dem Genort, der für den Komplementfaktor *C5* codiert. Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle im Entzündungs- und Apoptoseprozess von Zellen. Mutationen dieses Gens sind bereits mit einem erhöhten Risiko für eine Leberfibrose sowie die rheumatoide Arthritis in Verbindung gebracht worden (Hillebrandt et al., 2005; Plenge et al., 2007). Durch die Nähe der beiden Loci von *TRAF1* und *C5* könnte der SNP auch regulatorische Effekte auf beide Gene haben.

### **1.7 Fragestellung**

Unabhängig der Ätiologie ist die Leberfibrose als Vorstufe der Leberzirrhose die gemeinsame Endstrecke aller chronischen Lebererkrankungen. In den meisten Fällen sind diese Krankheiten multifaktoriell bedingt und werden durch Interaktionen von genetischen und exogenen Faktoren beeinflusst. Die hepatische Fibrose entsteht auf Basis einer nicht ausheilenden Entzündungsreaktion, die durch Noxen oder Autoimmunprozesse verursacht wird.

Für die unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber Noxen und Krankheiten werden vor allem Sequenzvarianten verantwortlich gemacht. Deshalb können sie auch der unterschiedlichen Ausprägung und Progression der Leberfibrose bei chronisch erkrankten Patienten zugrunde liegen.

Die Genprodukte von *DDX5*, welches das Protein p68 als Koaktivator für den Tumorsuppressor p53 kodiert, und *TRAF1*, das den gleichnamigen Aktivator des TNF-Rezeptors kodiert, spielen eine Rolle bei chronischen Entzündungen. Einzelnukleotidpolymorphismen dieser beiden Gene wurden bei genomweiten Assoziationsstudien als potentielle Risikofaktoren für die Leberfibrose identifiziert. Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe von kandidatengenbezogenen Assoziationsuntersuchungen, ob diese SNPs mit einer verstärkten Leberfibrose korrelieren und dementsprechend für eine vermehrte Fibrosierung mit verantwortlich sind.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Die Patientendaten wurden im Rahmen einer BONFOR-Studie im Jahre 2006 und 2007 an der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Bonn gesammelt. Die Patienten wurden vor der Blutabnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie. Als Ausschlusskriterium zur Teilnahme galt eine fehlende Einwilligung. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit nur Daten von Patienten kaukasischer Abstammung verwendet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt.

### **2.2 DNA-Extraktion und -Aufbereitung**

Den Studienteilnehmer wurde Blut abgenommen. Die genomische DNA kernhaltiger Leukozyten wurde aus diesem Blut, dem EDTA (Ethyldiamintetraacetat) als Antikoagulans zugesetzt war, isoliert. Folgendes Aussalzverfahren wurde dabei angewendet (Miller et al., 1988):

- 10 ml Frischblut wurden mit 30 ml Frischblutlysepuffer versetzt und geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurde bei 4° C und 1500 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wurde in 10 ml Kernlysepuffer resuspendiert und mit 0,7 ml 10 % SDS und 400 µl Pronase E (20mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
- Nach Zugabe von 3,2 ml gesättigter NaCl-Lösung (6M) wurde die Lösung kräftig geschüttelt und zweimal für 10 Minuten bei 2500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.
- Das entstandene Proteinpellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 1xVol Isopropanol versetzt und geschwenkt bis die DNA ausfiel.
- Das Präzipitat der DNA wurde mit einem Haken aus der Lösung gefischt und, nach Waschen in 70 % Ethanol, in 200-600 µl Tris-EDTA (pH 8,0) gelöst.

| Reagenzien              | Stoffkonzentration        |
|-------------------------|---------------------------|
| Frischblutlysepuffer    | 155 mM NH <sub>4</sub> Cl |
|                         | 10 mM KHCO <sub>3</sub>   |
|                         | 0,1 mM EDTA               |
| Kernlysepuffer (pH 8,2) | 10 mM Tris-HCl            |
|                         | 400 mM NaCl               |
|                         | 2 mM EDTA                 |
| 1x Tris-EDTA (pH 7,5)   | 1 mM EDTA                 |

Tab. 1: Reagenzien zur Extraktion der DNA

### 2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Photometers im UV-Bereich bestimmt. Auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich eine Aussage über die Dichte der untersuchten Probe machen. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der DNA zu. Werte unter 1,7 weisen auf eine Verunreinigung durch Substanzen wie Ethanol und Proteine hin, die bei 280 nm absorbieren. Quotienten über 1,9 lassen auf RNA-Rückstände im Isolat schließen. Die DNA liegt in ausreichend reiner Form vor, wenn der Wert zwischen 1,7 und 1,9 liegt.

### 2.4 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) der *DDX5*- sowie *TRAF1*-Gene zu untersuchen, wurde bei der extrahierten DNA eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bei der 1984 von Mullis und Faloona veröffentlichten PCR handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem sehr geringe Mengen von genetischer Substanz durch in vitro-Amplifikation exponentiell vermehrt werden können.

Grundsätzlich besteht die PCR aus den Zyklen der Denaturierung, Annealing und Extension. Bei 92 - 94 °C wird die DNA denaturiert, um die Doppelstränge in Einzelstränge aufzutrennen. In Abhängigkeit der verwendeten Primer wird die Temperatur dann auf 55 - 65 °C gesenkt, damit sich diese an die komplementäre Region der DNA anlagern können (Annealing, Primer-

hybridisierung). Anschließend findet die Verlängerung der DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 68 - 72 °C statt. Die zur Vervielfältigung verwendete DNA-Polymerase wird heutzutage aus dem *Escherichia coli*-Bakterium isoliert, das ein geklontes Gen thermophiler Bakterien exprimiert. Dadurch wird das Enzym unter den hohen Temperaturen der Denaturierung nicht inaktiviert. Nach dem Ursprungsbakterium *Thermus aquaticus* wird diese hitzestabile Polymerase Taq-Polymerase genannt. Zur Durchführung der Temperaturzyklen wird ein automatisierter Thermostat (Thermocycler) verwendet. Pro Minute kann die DNA-Polymerase etwa 1000 Basenpaare replizieren. Es werden etwa 30 Zyklen benötigt, um eine genügend hohe Menge des gewünschten Abschnittes zu erhalten.

Die Fortentwicklung der PCR ist die Real-Time PCR, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Neben der Vervielfältigung ist hierdurch auch die Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

#### **2.4.1 Genotypisierung der *TRAF1*- und *DDX5*-SNPs**

In der vorliegenden Arbeit wurde das TaqMan<sup>®</sup> System (Applied Biosystems) zur Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) des *DDX5*-Gens und des *TRAF1*-Gens verwendet. Hierbei werden dem PCR-Ansatz neben den spezifischen Primern zusätzlich Fluoreszenz-gekoppelte Oligonukleotid-Sonden zugegeben. Diese Sonden sind mit unterschiedlichen Donor- bzw. Akzeptorfarbstoffen markiert. Wenn die Sonde durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Donorfarbstoffes (Reporter, am 5'-Ende der Sonde) zwar abgegeben, jedoch durch die räumliche Nähe zu dem Akzeptorfarbstoff (am 3'-Ende der Sonde) unterdrückt (Quencher). Diesen Vorgang nennt man Fluoreszenz-Energietransfer (FRET = „fluorescence resonance energy transfer“). Bei der Elongation der Primer zerlegt nun die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease die Sonde in ihre Nukleotide. Nach der Trennung des Reporterfarbstoffes von dem Quencher-Molekül kommt es nicht mehr zu dem Energietransfer, so dass sich aus dem Anstieg der freien Reporterkonzentration ein wachsendes Fluoreszenzsignal ergibt. Dieses Signal ist proportional zur Amplifikation des spezifischen PCR-Produkts.

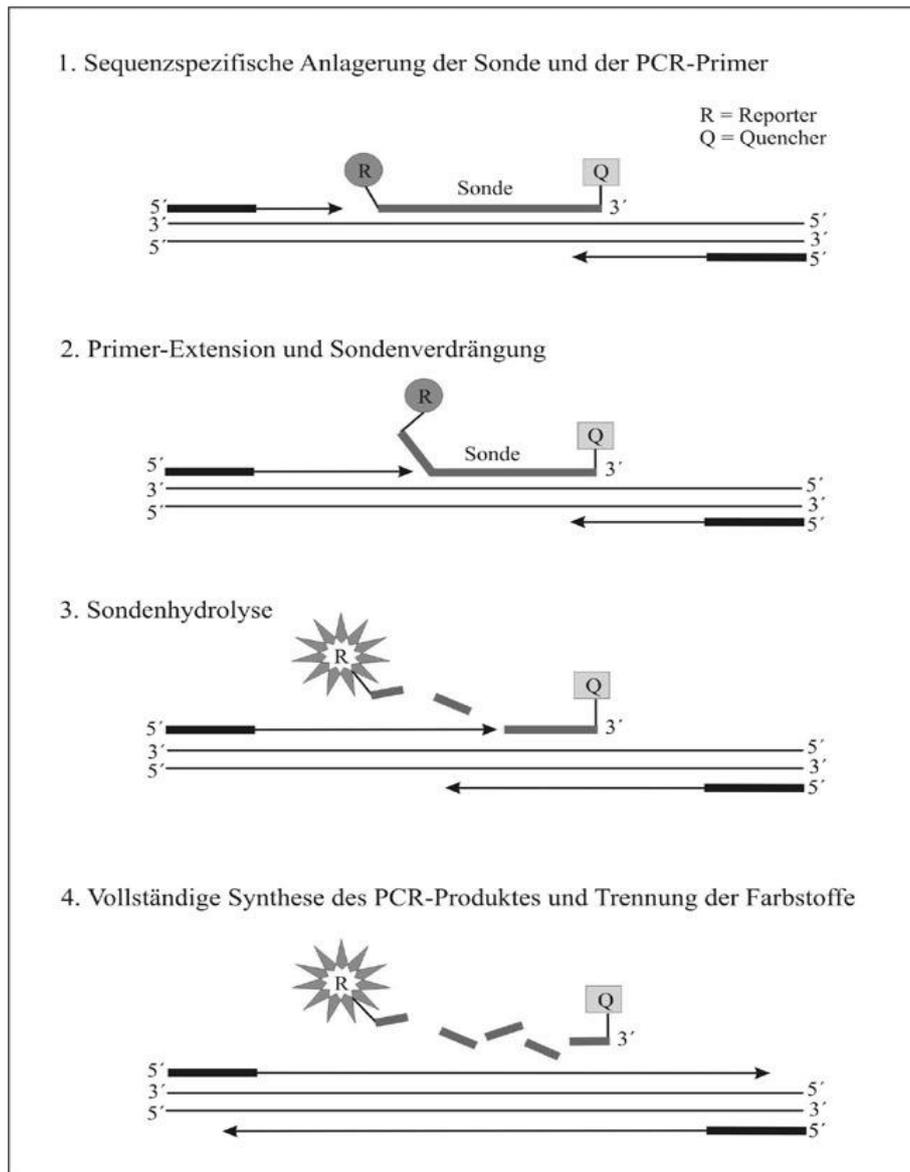


Abb. 5: Realtime PCR mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup>-Systems (Applied Biosystems)

In der vorliegenden Arbeit wurde 5 - 50 ng DNA in 20 µl Reaktionsansätzen amplifiziert. Neben den beiden Primern enthielten die Ansätze Taqman-Sonden mit den Reporter-Farbstoffen VIC und FAM und dem Quencher-Farbstoff MGB. Ein PCR-Zyklus gestaltete sich folgendermaßen: Nach der Denaturierung der DNA bei 95 °C für 10 Minuten schlossen sich 39 Zyklen mit 15 Sekunden Denaturierung bei 92 °C und 1 Minute Annealing/Extension bei 60 °C an.

| Reagenzien              | Stoffkonzentration |
|-------------------------|--------------------|
| 2x Mastermix Invitrogen | 5,25 µl            |
| ROX (Referenz)          | 0,25 µl            |
| 20x Genotyping Mix      | 0,63 µl            |
| H <sub>2</sub> O Merck  | 4,37 µl            |
| DNA 5-50 ng             | 2,00 µl            |
| Gesamt                  | 12,50 µl           |

Tab. 2: Zur PCR verwendete Reagenzien

Die verwendeten Sonden hatten folgende Sequenzen:

*TRAF1* ([VIC/FAM]):

TCTGTGGGTCCCTTCTCTCCCCTCC[A/G]GCCTCAATACCACCCTCTCTACCTG

*DDX5* ([VIC/FAM]):

ATTCCTATCAGTCATCCTTACCTG[C/A]ACCTCTGTCTTCGACCAACTGAAGC

Assay ID für *TRAF1* (rs3761847): C\_\_\_2783640\_10

Assay ID für *DDX5* (rs1140409) : c\_\_\_7450990\_10

## 2.5 Bestimmung des Leberfibrosestadiums

Zur Bestimmung des Fibrosestadiums wurden zwei verschiedene Untersuchungsverfahren angewandt, zum Einen die transiente Elastographie, zum Anderen die histologische Gewebeprobeuntersuchung nach einer Leberpunktion.

### 2.5.1 Transiente Elastographie

Das Ausmaß der Leberfibrose wurde mit Hilfe des FibroScan-Systems (Echosens, Paris) bestimmt. Dieses neue Ultraschallverfahren ermöglicht eine nicht-invasive Quantifizierung der Fibrose (Sandrin, 1999). Das Verfahren ist schmerzfrei für den Patienten, ambulant durchführbar und beliebig oft wiederholbar. Die Messung beruht auf dem Prinzip der transienten Elastographie. Durch einen speziellen Schallkopf, der einen Vibrationssender und eine 5-MHz-Ultraschallsonde enthält, wird eine mechanische Pulswelle über die Thoraxwand in die Leber gesendet. Durch diesen Impuls wird eine niederfrequente elastische Welle von 50 Hz erzeugt, die sich mit einer Geschwindigkeit von 1 m/s im Lebergewebe ausbreitet. Mithilfe der hochfrequenten Ultraschallwelle (1500 m/s) lässt sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Impulses messen. Die Geschwindigkeit erlaubt Rückschlüsse über die Festigkeit des Lebergewebes. Je steifer, d.h. fibrotischer das Gewebe ist, desto rascher wandert die Stoßwelle. Die Ergebnisse werden in kPa angegeben (Lörke, 2007).

In der Praxis wird die Ultraschallsonde in einem Interkostalraum auf Höhe des rechten Leberlappens platziert. Im Allgemeinen werden 10 Messungen durchgeführt, was etwa 5 Minuten beansprucht. Hieraus wird der Median der Messwerte ermittelt, wenn mindestens 60 % der Messungen erfolgreich durchgeführt wurden. Dabei entspricht die Messtiefe 25 bis 65 mm. Sollten die Messungen eine zu große Streubreite ergeben, wird eine weitere Messreihe in einem anderen Interkostalraum empfohlen. Als Qualitätsmerkmal für die Untersuchung wurde ein IQR (interquartile range) < 30 % des Medians bestimmt, den publizierten Standards entsprechend.



Abb. 6: FibroScan<sup>®</sup>. Mit freundlicher Genehmigung von Echosense, Paris

### 2.5.2 Leberbiopsie

Die histopathologische Untersuchung des Lebergewebes nach einer Leberbiopsie wird als "Goldstandard" zur Beurteilung der Leberbiopsie angesehen (Goodman, 2007). Die Punktion erfolgte perkutan oder transjugulär. Die Beurteilung der Gewebeproben wurde vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde als Klassifikationssystem zur Bestimmung des Fibrorestadiums das Staging nach Desmet und Scheuer verwendet. Die Fibrorestadien werden hierbei wie folgt eingeteilt:

| Fibrorestadium | Befund                       | Histologische Merkmale  |
|----------------|------------------------------|---|
| <b>0</b>       | Keine Fibrose                | Keine Faservermehrung   |
| <b>I</b>       | Milde/geringgradige Fibrose  | Portale Faservermehrung, keine Septen   |
| <b>II</b>      | Mäßige/mittelgradige Fibrose | Inkomplette oder komplette porto-portale Fasersepten, erhaltene Architektur                           |
| <b>III</b>     | Schwere/hochgradige Fibrose  | Septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung, kein Anhalt für kompletten zirrhotischen Umbau |
| <b>IV</b>      | Zirrhose                     | Zirrhotischer Umbau mit vollständig bindegewebig separierten oder fragmentierten Pseudolobuli         |

Tab. 3: Fibrose-Staging (nach Desmet und Scheuer), Konsens der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (Desmet et al., 1994; Scheuer, 1991; Schirmacher et al., 2004)

### 2.6 Statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von SPSS 18 (Statistical Package for social science, lizenziert für die Universität Bonn) sowie einem online verfügbaren Programm von Wienker und Strom (Helmholtz-Institut München, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) analysiert. Es wurde auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet. Die Verteilung der Allel- und Genotypen wurde zunächst mit einem exakten Test auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Die Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und dem Grad der Leberfibrose wurde mit Kontingenztafeln analysiert. Allelfrequenzen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test bemessen und Genotypdifferenzen mit dem Armitage-Trend-Test

bewertet. Die allel- und genotypspezifischen Risiken wurden als Odds Ratio mit 95 %- Konfidenzintervall geschätzt. In Regressionsanalysen wurden unabhängige Determinanten der Fibroseentstehung überprüft. Der Zusammenhang zwischen Histologie und Fibroscan wurde mit einer Korrelationsanalyse und dem Test nach Spearman untersucht.

## 2.7 Labormaterialien und Geräte

| Labormaterialien   | Hersteller                            |
|--|---------------------------------------|
| Einweg-Pipettenspitzen<br>10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf     |
| Einweg-Handschuhe, Satin Plus                            | SafeSkin, Californien                 |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml                 | Eppendorf, Hamburg                    |
| Micro-Amp optical 96-well reaction plate                 | Applied Biosystems, Foster City (USA) |

Tab. 4: Labormaterialien

| Geräte   | Hersteller                            |
|--|---------------------------------------|
| Feinwaage, BP61                                      | Sartorius, Göttingen                  |
| Taqman LS-50B PCR Detection System                   | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Photometer gene Quant                                | Pharmacia Biotech AB, Freiburg        |
| Eppendorf-Pipetten<br>10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Eppendorf, Hamburg                    |
| Zentrifuge 5415D                                     | Eppendorf, Hamburg                    |

Tab. 5: Geräte

| Reagenzien                   | Hersteller                            |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Mastermix Invitrogen         | Invitrogen, Carlsbad (USA)            |
| ROX (Referenz)               | Invitrogen, Carlsbad (USA)            |
| Sonden VIC und FAM           | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Primer                       | MWG Biotech, Ebersberg                |
| Wasser, nukleasefrei, steril | Fresenius AG, Bad Homburg             |

Tab. 6: Reagenzien

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 537 Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung zwischen 2006 und 2007 in diese Studie aufgenommen. Männer waren häufiger vertreten als Frauen (Tab. 7). Das mediane Alter lag bei 53 Jahren (18 - 88 Jahre). Die Patienten hatten im Mittel einen Body Mass Index (BMI = Gewicht/Größe<sup>2</sup>) von 25,24 kg/m<sup>2</sup> mit einer Standardabweichung von 4,32 kg/m<sup>2</sup>. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten waren kaukasischer Abstammung.

286 Patienten litten an einer chronischen Hepatitis C, 57 Patienten waren alkoholkrank (medianer Alkoholkonsum von 66 g Alkohol pro Tag). 54 Patienten hatten eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, bei 35 Patienten wurde eine chronische Hepatitis B diagnostiziert, bei 25 Patienten konnte keine eindeutige Ursache für die Leberfibrose identifiziert werden. Bei 22 Patienten lag eine Hämochromatose vor, 21 Patienten wurden aufgrund einer primär biliären Zirrhose behandelt und bei 18 Patienten war eine Autoimmunhepatitis als Ursache der Leberfibrose erkannt worden. Bei den weiteren Patienten waren eine primär sklerosierende Cholangitis oder eine toxische Ursache für die Fibrose diagnostiziert worden (Tab. 7).

Bei 403 der 537 Patienten wurden keine weiteren hepatisch relevanten Erkrankungen diagnostiziert. Bei 25 % der Patienten wurde eine Nebendiagnose gestellt. Besonders ist darauf hinzuweisen, dass bei 65 Patienten eine Hämophilie A vorlag. Von ihnen hatten sich 31 Patienten mit dem Human immunodeficiency virus (HIV) infiziert. 25 Patienten waren HCV/HIV koinfiziert (8,2 % der HCV-Patienten), zwei Patienten waren HBV/HIV koinfiziert. Ein Patient mit unklarer Ursache seiner Lebererkrankung war ebenfalls HIV-positiv. Bei 7 Patienten lag zusätzlich ein hepatozelluläres Karzinom vor. Bei 119 Patienten war histologisch bzw. klinisch (durch pathognomonische Komplikationen wie Aszites) eine Leberzirrhose gesichert worden. 209 Patienten gaben an, regelmäßig Alkohol zu trinken; im Median wurde 8,8 g Alkohol pro Tag von dieser Gruppe getrunken.

| <b>Patientenkollektiv</b>   |             |
|---|-------------|
| <b>Patientenzahl N</b>  | 537         |
| <b>Medianes Alter (Spannweite)</b>  | 53 (18-88)  |
| <b>Geschlecht (Männer:Frauen)</b>   | 291:246     |
| <b>Hauptdiagnose</b>  |             |
| Hepatitis C   | 286 (53 %)  |
| Alkoholabusus   | 57 (10,6 %) |
| Nicht alkoholische Steatohepatitis  | 54 (10,1 %) |
| Hepatitis B   | 35 (6,5 %)  |
| Angeborene Krankheiten (Hämochromatose, $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel, M.Wilson)  | 25 (4,7 %)  |
| Andere Ursachen (primär biliäre Zirrhose, Autoimmunhepatitis, primär sklerosierende Cholangitis, toxische Ursache, unklare Ursache) | 80 (14,9 %) |

Tab. 7: Patientenkollektiv mit Häufigkeiten der Hauptdiagnosen

### 3.2 Leberfibrose

Mithilfe des Fibroscans wurde die Schwere der Leberfibrose bei 498 Patienten beurteilt. Der Median der Fibroscanwerte in der Gesamtkohorte betrug 6,6 kPa bei einem Interquartilsabstand (IQR) von 7,0 kPa. Bei den männlichen Patienten wurde mit 6,9 kPa im Gegensatz zu den weiblichen Patienten mit 6,3 kPa ein höherer Median der Lebersteifigkeit gemessen; dieser Unterschied war nicht signifikant. Der minimale Fibroscanwert lag bei 2,2 kPa, der maximale Wert bei 75 kPa. Im Mittel hatte die Gesamtkohorte einen Fibroscanwert von 12,3 kPa bei einer Standardabweichung von 14,1 kPa.

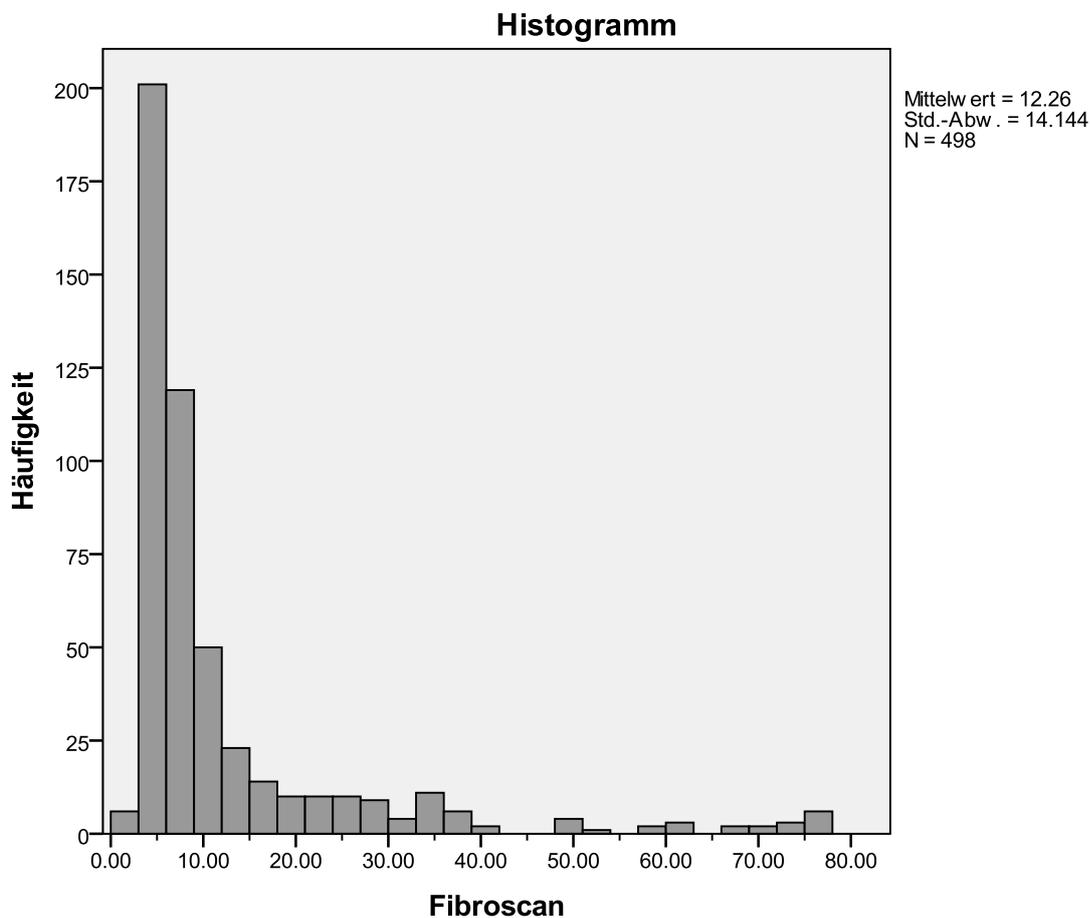


Abb. 7: Verteilung der Fibroscanwerte in der Gesamtkohorte

In der Subgruppe der 286 Hepatitis C-Patienten wurde ein medianer Fibroscan von 6,8 kPa bestimmt (IQR: 6,5 kPa). Der höchste Wert lag bei 66,4 kPa. Die Spannweite wurde mit 63,7 kPa berechnet. Bei den 35 Hepatitis B-Patienten wurde ein Median des Fibroscanwertes von 5,0 kPa bei einem Interquartilsabstand von 4,4 kPa und einer Spannweite von 71,3 kPa gemessen. Unter den alkoholkranken Patienten wurde ein generell deutlich höherer Fibroscanwert ermittelt. Der



Die Patienten mit einer Leberzirrhose (histologisch oder klinisch gesichert) hatten im Mittel einen Fibroscan von 31,0 kPa bei einer Standardabweichung von 19,7 kPa. Bei einer Spannweite von 69,9 kPa und einem Interquartilsabstand von 19,45 kPa betrug der Median 26,0 kPa.

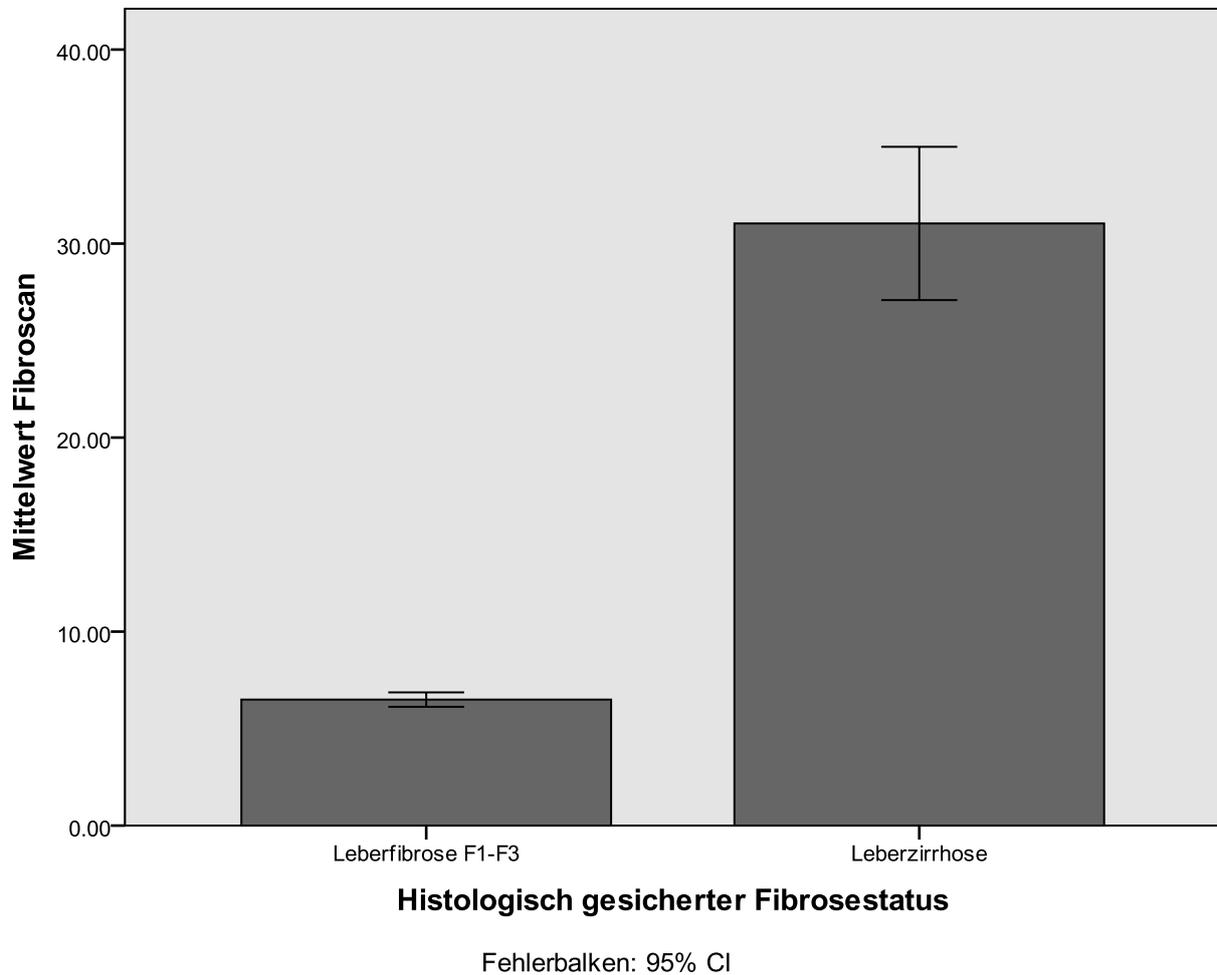


Abb. 9: Zusammenhang der Histologie mit der Lebersteifigkeit

Im Verlauf wurden im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie Subgruppen anhand der Fibroscanwerte sowie der histologischen Daten gebildet. Die Festlegung spezifischer Cut-off Werte ist – insbesondere in Kollektiven mit unterschiedlicher Ätiologie – umstritten. In einer Studie an gesunden Kontrollen wurden Werte bis 7,0 als Grenze festgelegt, wobei die medianen Werte bei Frauen und Männern zwischen 4,5 und 5,5 kPa lagen (Roulot et al., 2008). Werte über 12,5 bzw. 17,5 kPa weisen mit einer hohen Sensitivität auf eine schwere Fibrose/Zirrhose hin (Carrion et al., 2006; Castera et al., 2005; Erhardt et al. 2006; Foucher et al., 2006; Grünhage und Lammert, 2009; Ziol et al., 2005).

| <b>Autoren</b>       | <b>Anzahl der Patienten</b> | <b>Erkrankung</b>       | <b>Grenzwert für F=4</b> | <b>Ergebnisse</b>                     |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Carrión et al., 2006 | 124                         | HCV                     | 12,5 kPa                 | Sensitivität 100 %<br>Spezifität 87 % |
| Castera et al., 2005 | 183                         | HCV                     | 12,5 kPa                 | Sensitivität 87 %<br>Spezifität 91 %  |
| Erhardt et al., 2006 | 147                         | Verschiedene Ätiologien | 13,0 kPa                 | Sensitivität 90 %<br>Spezifität 82 %  |
| Foucher et al., 2006 | 354                         | Verschiedene Ätiologien | 17,6 kPa                 | Sensitivität 77 %<br>Spezifität 97 %  |
| Ziol et al., 2005    | 327                         | HCV                     | 14,6 kPa                 | Sensitivität 86 %<br>Spezifität 96 %  |

Tab. 8: Wertigkeit der transienten Elastographie für die Diagnose einer Leberzirrhose. Angaben aus verschiedenen Referenzen mit Leberbiopsien als Referenz

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit drei Analysegruppen mit verschiedenen Cut-offs definiert (s. Tab. 9):

Analysegruppe 1: Hier wurde versucht, phänotypische Extreme zu definieren, so dass nur Patienten ohne wesentliche Erhöhung der Lebersteifigkeit ( $< 7,0$  kPa) und Patienten mit deutlich erhöhter Lebersteifigkeit ( $> 12,5$  kPa) eingeschlossen wurden.

Analysegruppe 2 & 3: Diese Einteilungen differenziert anhand verschiedener Cut-off Werte Patienten mit und ohne Leberzirrhose (12,5 bzw. 17,5 kPa).

Außerdem wurden die Fall- und Kontrollgruppe mithilfe der histologischen Daten definiert.

|                              | <b>Kontrollgruppe</b>     | <b>Fallgruppe</b>         |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Histologisch/klinisch</b> | Fibrose F0 - F3           | Zirrhose F4               |
| <b>Analysegruppe 1</b>       | Fibroscan $\leq 7,0$ kPa  | Fibroscan $\geq 12,5$ kPa |
| <b>Analysegruppe 2</b>       | Fibroscan $\leq 12,4$ kPa | Fibroscan $\geq 12,5$ kPa |
| <b>Analysegruppe 3</b>       | Fibroscan $\leq 12,4$ kPa | Fibroscan $\geq 17,6$ kPa |

Tab. 9: Einteilung der Patientengruppen nach histologischen Untersuchungen und Fibroscan-werten

Mithilfe einer Korrelationsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen dem histologisch bzw. klinisch gesicherten Fibrostatus und dem Fibroscanwert untersucht. Dabei ergab sich aus dem Test nach Spearman ein Korrelationskoeffizient von 0,702. Hieraus ist ersichtlich, dass mit einem p-Wert von  $< 0,001$  ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fibrose und dem Fibroscanwert besteht.

### 3.3 Genotypisierung des *DDX5*-SNP

Mit Hilfe der Realtime-PCR wurde der Genotyp des SNP p.S480A (rs1140409) des *DDX5*-Gens, das auf dem Chromosom 17 liegt, bei 524 Patienten bestimmt. Bei 467 Patienten konnte der homozygote Wildtyp des Einzelnukleotidpolymorphismus des *DDX5*-Gens festgestellt werden. 55 Patienten waren heterozygot, und bei 2 Patienten konnte die homozygote Variante p.S480A nachgewiesen werden (Tab. 10). Die Allelfrequenz des Allels A (Wildtyp) betrug im Gesamtkollektiv 0,94.

| Genotypen                 | Häufigkeit N | Prozent |
|---------------------------|--------------|---------|
| <i>Genotyp AA</i>         | 467          | 89,1    |
| <i>Genotyp AC</i>         | 55           | 10,5    |
| <i>Genotyp CC</i>         | 2            | 0,4     |
| <b>Gesamtanzahl</b>       | 524          | 100,0   |
| <i>Minorallelfrequenz</i> | 0,06         |         |

Tab. 10: Häufigkeiten der *DDX5*-Genotypen der Patienten

### 3.4 Genotypisierung des *TRAF1*-SNP

Die häufige intergenetische Variante auf dem *TRAF1-C5* Locus des Chromosoms 9, der SNP mit der Nummer rs3761847, wurde ebenfalls mit der Realtime-PCR genotypisiert. Hier wurde 259 heterozygote Allelträger bestimmt, 187 Patienten waren homozygot für das Allel A, und 90 Patienten waren homozygote Träger für das Allel G (Tab. 11). Die Allelfrequenz im Gesamtkollektiv des Allels A betrug 0,59; damit war das Allel G das seltenere Allel (41 %).

| <b>Genotypen</b>          | <b>Häufigkeit N</b> | <b>Prozent</b> |
|---------------------------|---------------------|----------------|
| <i>Genotyp AA</i>         | 187                 | 34,9           |
| <i>Genotyp AG</i>         | 259                 | 48,3           |
| <i>Genotyp GG</i>         | 90                  | 16,8           |
| <b>Gesamtanzahl</b>       | 536                 | 100,0          |
| <i>Minorallelfrequenz</i> | 0,41                |                |

Tab. 11: Häufigkeiten der Allele von *TRAF1*

### 3.5 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium beschreibt ein 1908 von Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg abgeleitetes mathematisches Modell aus dem Bereich der Populationsgenetik. Dabei nimmt man eine ideale Population, in der sich die Häufigkeiten von Allelen und Genotypen aufgrund eines modellierten Gleichgewichts nicht verändern, an. Dabei wird davon ausgegangen, dass 1. die Population ausreichend groß ist, dass 2. alle Paarungen der Individuen untereinander gleich wahrscheinlich und gleich erfolgreich sind, dass 3. Selektion ausgeschlossen ist und keine Mutationen stattfinden und dass es 4. zu keiner Migration, d.h. zu keinem Genimport oder -export, kommt (Aichinger und Grimm, 2008).

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht arbeitet mit zwei Formeln, wobei  $p$  die relative Häufigkeit des Auftretens von Allel A ist und  $q$  relative Häufigkeit des Auftretens von Allel a bezeichnet.

Es gilt:  $p+q=1$  für die Allele und  
 $p^2+2pq+q^2=1$  für die Genotypen.

Mit Hilfe von Kontingenztafeln können Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft werden, zum Einen können sie auf einen Verstoß gegen die zugrunde liegenden Annahmen, wie z.B. eine zu geringe Populationsgröße, hinweisen, zum Anderen können sie Zeichen für Fehler bei der Genotypisierung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Genotyphäufigkeiten der Patienten mit einer Fibrose F0-F3 als Kontrollen bezeichnet und die der Patienten mit einer Zirrhose F4 als Fälle (siehe 3.2.). Diese wurden auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium getestet. Die Allelfrequenzen beider SNPs befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $p > 0,05$ ).

Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht können auch graphisch illustriert werden. Die vom italienischen Statistiker Bruno de Finetti benannten Diagramme in Form gleichseitiger Dreiecke mit einer Hardy-Weinberg-Parabel geben einen raschen Überblick über die Allel- und Genotypfrequenzen. Jeder Populationszustand kann durch einen Punkt innerhalb des Dreiecks dargestellt werden. Dabei gibt die Y-Achse die Genotypfrequenz 12 (AC bei *DDX5*, AG bei *TRAF1*), die linke Dreiecksachse die Genotypfrequenz des Genotyps 11 (AA bei *DDX5* und *TRAF1*) und die rechte Dreiecksachse die Genotypfrequenz des Genotyps 22 (CC bei *DDX5*, GG bei *TRAF1*) an. Die X-Achse zeigt die Allelfrequenz des Majorallels 1 (Allel A bei *DDX5* und Allel A bei *TRAF1*) an.

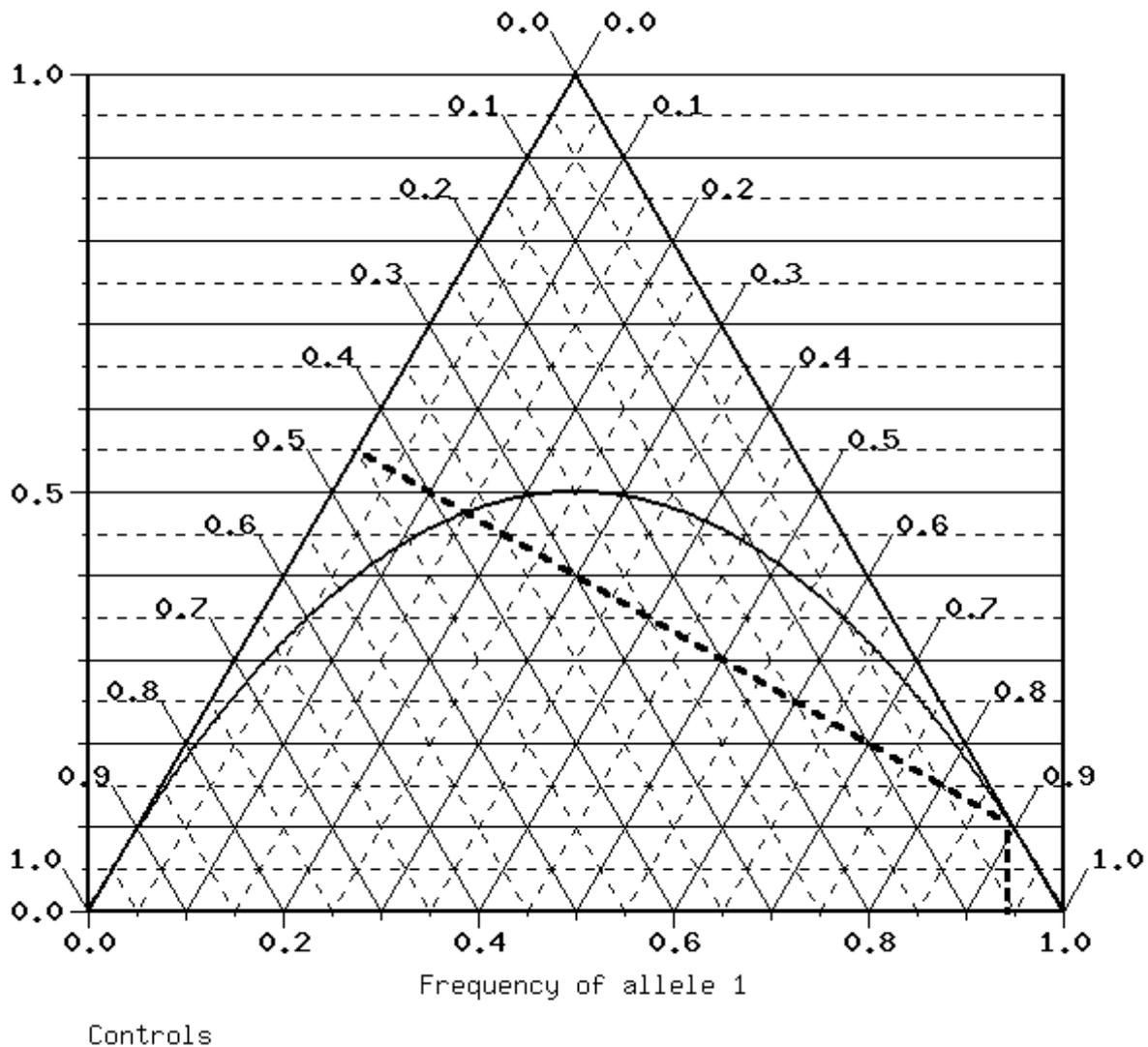


Abb. 10: De Finetti-Diagramm der Genotypen des *DDX5*-SNP im Gesamtkollektiv. Die Y-Achse gibt die Heterozygotenfrequenz, die linke Dreieckachse die Häufigkeit der Träger des Genotyps AA und die rechte Dreieckachse die Häufigkeit der Träger des Genotyps CC an. Auf der X-Achse ist Allelfrequenz des Majorallels A abgetragen. Die Parabel zeigt Genotypverteilungen, die dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen, an.

In Abb. 10 ist die Gesamtpopulation der *DDX5*-Genotypen dargestellt. Die Häufigkeiten der Genotypen liegen auf der Hardy-Weinberg-Parabel.

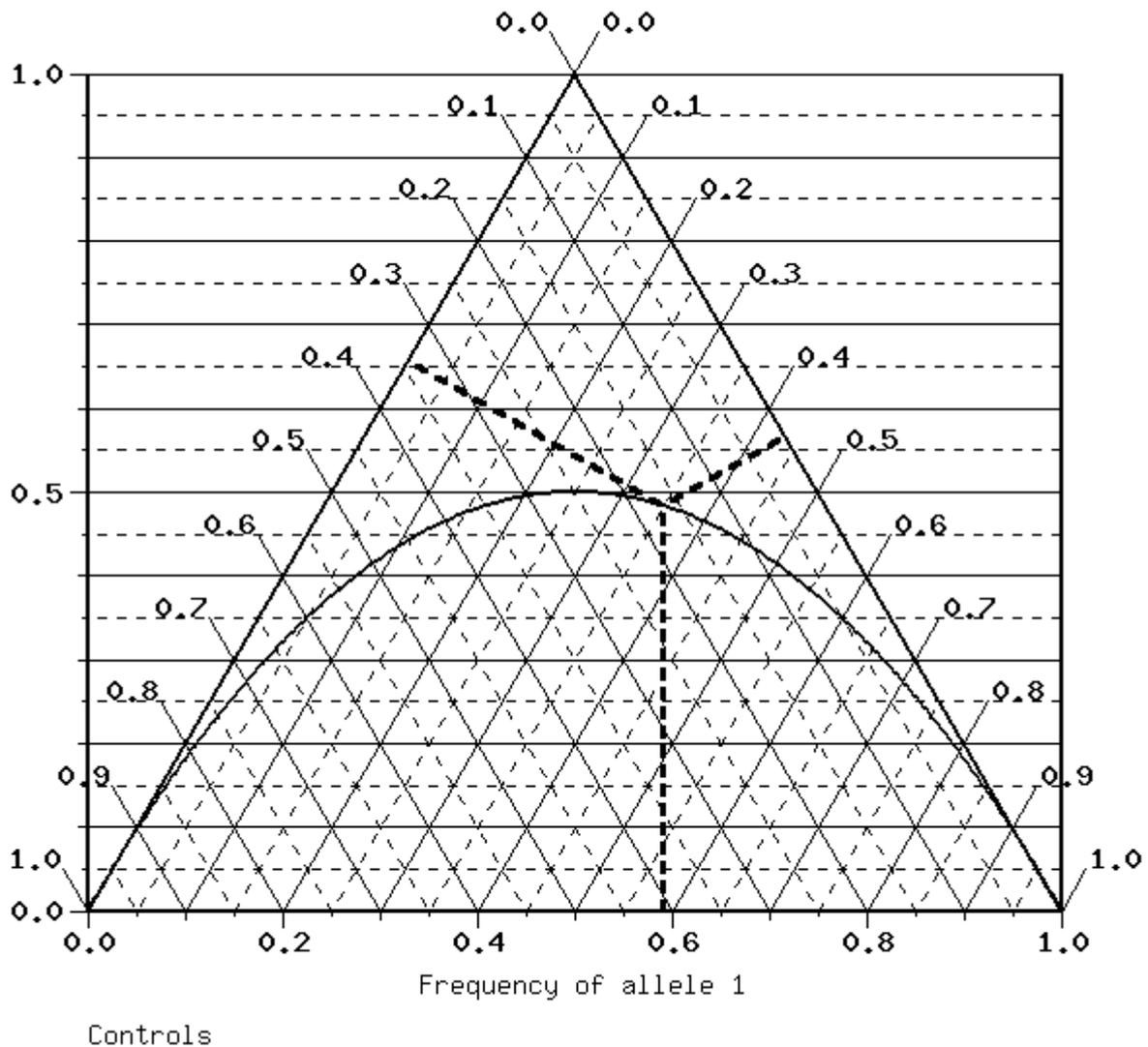


Abb. 11: De Finetti-Diagramm der Genotypen des *TRAF1*-SNP im Gesamtkollektiv. Die Y-Achse gibt die Heterozygotenfrequenz, die linke Dreieckachse die Häufigkeit der Träger des Genotyps AA und die rechte Dreieckachse die Häufigkeit der Träger des Genotyps GG an. Auf der X-Achse ist Allelfrequenz des Majorallels A abgetragen. Die Parabel zeigt Genotypverteilungen, die dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen, an.

In Abb. 11 ist die Gesamtpopulation der *TRAF1*-Genotypen dargestellt. Die Häufigkeiten der Genotypen liegen auf der Hardy-Weinberg-Parabel.

### 3.6 Assoziationsstudie zu *DDX5*

Bei der Genotypanalyse waren 467 Patienten homozygot für das Allel A, 55 heterozygot und 2 Patienten homozygot für das Allel C des Einzelnukleotidpolymorphismus des *DDX5*-Gens. Da der Zusammenhang zwischen den Genotypen und der Ausprägung der hepatischen Fibrose untersucht werden sollte, wurden die Patienten zum Einen mit Hilfe der histologischen Daten, zum Anderen mit den Fibroscandaten in Fall- und Kontrollgruppen eingeteilt (Tab. 9). Fibroscan-Ergebnisse lagen nicht für das gesamte Kollektiv vor. Dies lässt sich unter anderem damit erklären, dass der Fibroscan bei Adipositas oder Aszites nicht bei allen Patienten durchführbar war.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Assoziationsstudie zu *DDX5* mit Angaben zu Allel- und Genotypverteilung, zunächst im Gesamtkollektiv, anschließend im Bezug auf die Subgruppe der aktiv HCV-infizierten Patienten tabellarisch zusammengefasst.

#### 3.6.1 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv

Nachfolgend die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus im Gesamtkollektiv.

| <i>DDX5</i> p.S480A        |                       |                  |
|----------------------------|-----------------------|------------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (2N = 588) | Fälle (2N = 228) |
| A                          | 555                   | 213              |
| C                          | 33                    | 15               |
| AA                         | 263 (89,4 %)          | 99 (86,8 %)      |
| AC                         | 29 (9,9 %)            | 15 (13,2 %)      |
| CC                         | 2 (0,7 %)             | 0 (0,0 %)        |
| Assoziationstest           | $\chi^2$              | P                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,28                  | 0,598            |
| Armitage-Trend-Test        | 0,27                  | 0,603            |

Tab. 12: Assoziationsstudie zu *DDX5*. Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus (Kontrollen = F0-3, Fälle = F4)

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung in der Analysegruppe 1 im Gesamtkollektiv.

| <b>DDX5 p.S480A</b>        |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 528)</b> | <b>Fälle (2N = 226)</b> |
| A                          | 496                          | 213                     |
| C                          | 32                           | 13                      |
| AA                         | 234 (88,6 %)                 | 100 (88,5 %)            |
| AC                         | 28 (10,6 %)                  | 13 (11,5 %)             |
| CC                         | 2 (0,8 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,03                         | 0,870                   |
| Armitage-Trend-Test        | 0,03                         | 0,872                   |

Tab. 13: **Assoziationsstudie zu DDX5. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  7,0 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa)

Die Allel- und Genotypverteilung in Analysegruppe 2 des Gesamtkollektivs wird im Folgenden dargestellt.

| <b>DDX5 p.S480A</b>        |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 746)</b> | <b>Fälle (2N = 226)</b> |
| A                          | 702                          | 213                     |
| C                          | 44                           | 13                      |
| AA                         | 331 (88,7 %)                 | 100 (88,5 %)            |
| AC                         | 40 (10,7 %)                  | 13 (11,5 %)             |
| CC                         | 2 (0,6 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,01                         | 0,935                   |
| Armitage-Trend-Test        | 0,01                         | 0,935                   |

Tab. 14: **Assoziationsstudie zu DDX5. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa)

Hier die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung in Analysegruppe 3 im Gesamtkollektiv.

| <b>DDX5 p.S480A</b>        |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 746)</b> | <b>Fälle (2N = 166)</b> |
| A                          | 702                          | 158                     |
| C                          | 44                           | 8                       |
| AA                         | 331 (88,7 %)                 | 75 (90,4 %)             |
| AC                         | 40 (10,7 %)                  | 8 (9,7 %)               |
| CC                         | 2 (0,6 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,29                         | 0,588                   |
| Armitage-Trend-Test        | 0,29                         | 0,592                   |

Tab. 15: **Assoziationsstudie zu DDX5. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  17,6 kPa)

Da insgesamt auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet wurde, darf in der Gesamtkohorte zwischen der Ausprägung der Leberfibrose und dem Genotyp des Einzelnukleotidpolymorphismus des *DDX5*-Gens keine Assoziation angenommen werden. Es konnten auch keine Unterschiede der Minorallelfrequenzen zwischen der Fall- und Kontrollgruppe gefunden werden.

### 3.6.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Kollektiv der HCV-Patienten

Eine wesentliche Untergruppe des Gesamtkollektivs stellten Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Virusinfektion, die im Folgenden nochmals separat analysiert wurden. Eine aktive HCV- Infektion wurde als Nachweis einer HCV-RNA im Serum definiert. Diese Gruppe enthielt nur Patienten mit einer replikativen Hepatitis C und schloss damit alle Patienten aus, die auf eine antivirale Therapie angesprochen hatten, da nach Heilung der HCV-Infektion eine Regredienz der Fibrose zu erwarten war. Sie umfasste auch Patienten, bei denen keine dauerhafte Elimination der Virusinfektion erreicht werden konnte ("Relapse", "Non-Response"). Insgesamt wiesen 260 der insgesamt 524 für den *DDX5*-SNP genotypisierten Patienten zum Einschluss in die Studie eine aktive HCV-Infektion auf.

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der *DDX5*-Varianten bei histologisch gesichertem Fibrosestatus im Kollektiv der HCV-Patienten.

| <b><i>DDX5</i> p.S480A</b> |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 284)</b> | <b>Fälle (2N = 100)</b> |
| A                          | 272                          | 92                      |
| C                          | 12                           | 8                       |
| AA                         | 131 (92,3 %)                 | 42 (84 %)               |
| AC                         | 10 (7,0 %)                   | 8 (16 %)                |
| CC                         | 1 (0,7 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 2,13                         | 0,144                   |
| Armitage-Trend-Test        | 2,03                         | 0,154                   |

Tab. 16: Assoziationsstudie zu *DDX5*. Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus (Kontrollen = F0-3, Fälle = F4)

Tabelle 17 stellt die Allel- und Genotypverteilung der *DDX5*-Varianten in der Analysegruppe 1 dar.

| <b><i>DDX5</i> p.S480A</b> |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 252)</b> | <b>Fälle (2N = 120)</b> |
| A                          | 239                          | 113                     |
| C                          | 13                           | 7                       |
| AA                         | 114 (90,5 %)                 | 53 (88,3 %)             |
| AC                         | 11 (8,7 %)                   | 7 (11,7 %)              |
| CC                         | 1 (0,8 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,07                         | 0,787                   |
| Armitage-Trend-Test        | 0,07                         | 0,792                   |

Tab. 17: Assoziationsstudie zu *DDX5*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1 (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  7,0 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa)

Nachstehend die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung in Analysegruppe 2 im Kollektiv der HCV-Patienten.

| <b>DDX5 p.S480A</b>        |                              |                         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 366)</b> | <b>Fälle (2N = 120)</b> |
| A                          | 147                          | 113                     |
| C                          | 19                           | 7                       |
| AA                         | 165 (90,2 %)                 | 53 (88,3 %)             |
| AC                         | 17 (9,3 %)                   | 7 (11,7 %)              |
| CC                         | 1 (0,5 %)                    | 0 (0,0 %)               |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>                |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,07                         | 0,786                   |
| Armitage-Trend-Test        | 0,07                         | 0,789                   |

Tab. 18: **Assoziationsstudie zu DDX5. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa)

Die Verteilung der Allele und Genotypen in Analysegruppe 3 im HCV-Kollektiv im Folgenden.

| <b>DDX5 p.S480A</b>        |                              |                        |
|----------------------------|------------------------------|------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (2N = 366)</b> | <b>Fälle (2N = 90)</b> |
| A                          | 147                          | 85                     |
| C                          | 19                           | 5                      |
| AA                         | 165 (90,2 %)                 | 40 (88,9 %)            |
| AC                         | 17 (9,3 %)                   | 5 (11,1 %)             |
| CC                         | 1 (0,5 %)                    | 0 (0,0 %)              |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>   | <b>P</b>               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,02                         | 0,798                  |
| Armitage-Trend-Test        | 0,02                         | 0,891                  |

Tab. 19: **Assoziationsstudie zu DDX5. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  17,6 kPa)

Da auch hier auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet wurde, darf ebenso in der Subkohorte der HCV-infizierten Patienten zwischen der Ausprägung der Leberfibrose und den unterschiedlichen Genotypen des Einzelnukleotidpolymorphismus des *DDX5*-Gens keine Assoziation angenommen werden.

Zusammenfassend ließ sich demnach zwischen den Genotypen des *DDX5*-SNPs und dem Stadium der fibrotischen Leberveränderungen keine Assoziation nachweisen.

### 3.7 Assoziationsstudie zu *TRAF1*

Bei der Genotypanalyse der 536 für *TRAF1* genotypisierten Studienteilnehmer waren 187 Patienten homozygot für das häufigere Allel A. 259 Patienten waren heterozygot für den untersuchten Locus, und 90 der Teilnehmer waren Homozygoten für das seltenere Allel G des *TRAF1*-SNP. Auch diese Genotypisierung wurde auf ihre statistische Signifikanz bezüglich der Ausprägung der hepatischen Fibrose untersucht.

#### 3.7.1 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv

Die folgende Tabelle zeigt die Assoziationsstudie zur Allel- und Genotypverteilung der *TRAF1*-Varianten im Gesamtkollektiv bei histologisch gesichertem Fibrosestatus.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 602) | Fälle (N = 238) |
| A                          | 335                  | 157             |
| G                          | 267                  | 81              |
| AA                         | 94 (31,2 %)          | 51 (42,9 %)     |
| AG                         | 147 (48,9 %)         | 55 (46,2 %)     |
| GG                         | 60 (19,9 %)          | 13 (10,9 %)     |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 7,48                 | 0,006           |
| Armitage-Trend-Test        | 7,42                 | 0,006           |
| Odds Ratio Statistik       | OR                   | 95 % C.I.       |
| [G]↔[A]                    | 1,545                | 1,130-2,112     |
| [GG]↔[AG]                  | 1,727                | 0,879-3,391     |
| [GG]↔[AA]                  | 2,504                | 1,256-4,991     |
| [AA+AG]↔[GG]               | 2,030                | 1,069-3,856     |

Tab. 20: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus** (Kontrollen = F0-3, Fälle = F4). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

Die Minorallelfrequenz für rs3761847 unterschied sich signifikant (0,443 vs. 0,340,  $p = 0,006$ ) zwischen den Patienten mit milder und schwerer Fibrose in diesem Kollektiv. Die allelische Odds

Ratio (OR) bezogen auf das Risikoallel A betrug 1,545 bei einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 1,130 - 2,112.

Die Ergebnisse der Assoziationsstudie in der Analysegruppe 1 im Gesamtkollektiv werden in Tabelle 21 dargestellt.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 536) | Fälle (N = 234) |
| A                          | 293                  | 144             |
| G                          | 243                  | 90              |
| AA                         | 79 (29,5 %)          | 41 (35,0 %)     |
| AG                         | 135 (50,4 %)         | 62 (53,0 %)     |
| GG                         | 54 (20,1 %)          | 14 (12,0 %)     |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 3,14                 | 0,077           |
| Armitage-Trend-Test        | 3,28                 | 0,070           |
| Odds Ratio Statistik       | OR                   | 95 % C.I.       |
| [GG]↔[AA]                  | 2,002                | 0,996-4,025     |

Tab. 21: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1 (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  7,0 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

Bei dieser Einteilung der Lebersteifigkeit ließ sich tendentiell ein Zusammenhang erkennen, wobei insbesondere der homozygote Genotyp [AA] häufiger bei den Fällen auftrat.

Hier die Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2 im Gesamtkollektiv.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 760) | Fälle (N = 234) |
| A                          | 429                  | 144             |
| G                          | 331                  | 90              |
| AA                         | 122 (32,1 %)         | 41 (35,0 %)     |
| AG                         | 185 (48,7 %)         | 62 (53,0 %)     |
| GG                         | 73 (19,2 %)          | 14 (12,0 %)     |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 1,90                 | 0,168           |
| Armitage-Trend-Test        | 1,93                 | 0,164           |

Tab. 22: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa).

Bei der Einteilung der Leberfibrose mithilfe dieser Klassifikation fand sich keine Assoziation zwischen Genotyp und Ausprägung der Fibrose.

Nachfolgend die Ergebnisse der Assoziationsstudie zu *TRAF1* in der Analysegruppe 3.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 760) | Fälle (N = 174) |
| A                          | 429                  | 113             |
| G                          | 331                  | 61              |
| AA                         | 122 (32,1 %)         | 34 (39,1 %)     |
| AG                         | 185 (48,7 %)         | 45 (51,7 %)     |
| GG                         | 73 (19,2 %)          | 8 (9,2 %)       |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 4,20                 | 0,041           |
| Armitage-Trend-Test        | 4,24                 | 0,039           |
| Odds Ratio Statistik       | OR                   | 95 % C.I.       |
| [G]↔[A]                    | 1,429                | 1,014-2,014     |
| [GG]↔[AG]                  | 2,220                | 0,998-4,937     |
| [GG]↔[AA]                  | 2,543                | 1,117-5,791     |
| [AA+AG]↔[GG]               | 2,348                | 1,086-5,075     |

Tab. 23: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3 (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  17,6 kPa). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

Wurde die Ausprägung der Leberfibrose mithilfe dieser Klassifizierung unterschieden, fand sich wiederum ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Fibrosestatus, der einen Einfluss des *TRAF1*-SNP auf den Prozess der Fibrose vermuten lässt. Die allelische OR bezogen auf das Risikoallel A betrug 1,429. Eine Homozygotie für das Allel A im Vergleich zum Genotypen [GG] ging mit einem etwa 2,5-fach erhöhten Risiko, an einer schweren Fibrose zu erkranken, einher (OR = 2,543, p = 0,039).

### 3.7.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Kollektiv der HCV-Patienten

In dieser Assoziationsstudie wurde ebenfalls eine Subgruppenanalyse der Patienten mit der Hauptdiagnose Hepatitis C durchgeführt. Wie bereits bei dem anderen untersuchten SNP enthielt auch hier die Gruppe nur Relapser und Nonresponder, d.h. therapienaive Patienten und solche, die im Vorfeld eine Therapie erhalten hatten, bei denen jedoch keine dauerhafte Viruselimination erreicht wurde.

Tabelle 24 stellt die Allel- und Genotypverteilung der *TRAF1*-Varianten bei histologisch gesichertem Fibrosestatus dar.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 290) | Fälle (N = 102) |
| A                          | 166                  | 63              |
| G                          | 124                  | 39              |
| AA                         | 48 (33,1 %)          | 20 (39,2 %)     |
| AG                         | 70 (48,3 %)          | 23 (45,1 %)     |
| GG                         | 27 (18,6 %)          | 8 (15,7 %)      |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,64                 | 0,425           |
| Armitage-Trend-Test        | 0,62                 | 0,430           |

Tab. 24: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus (Kontrollen = F0-3, Fälle = F4).

Nachfolgend die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1 im HCV-Kollektiv tabellarisch dargestellt.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 254) | Fälle (N = 122) |
| A                          | 146                  | 71              |
| G                          | 108                  | 51              |
| AA                         | 42 (33,1 %)          | 18 (29,5 %)     |
| AG                         | 62 (48,8 %)          | 35 (57,4 %)     |
| GG                         | 23 (18,1 %)          | 8 (13,1 %)      |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,02                 | 0,895           |
| Armitage-Trend-Test        | 0,02                 | 0,892           |

Tab. 25: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1 (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  7,0 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa).

Im Anschluss zeigt Tabelle 26 die Assoziationsstudie zu *TRAF1* bei Analysegruppe 2 im Kollektiv der HCV-Patienten.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 372) | Fälle (N = 122) |
| A                          | 217                  | 71              |
| G                          | 155                  | 51              |
| AA                         | 65 (34,9 %)          | 18 (29,5 %)     |
| AG                         | 87 (46,8 %)          | 35 (57,4 %)     |
| GG                         | 34 (18,3 %)          | 8 (13,1 %)      |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,00                 | 0,979           |
| Armitage-Trend-Test        | 0,00                 | 0,979           |

Tab. 26: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2 (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa).

Nachstehend die Ergebnisse zur Assoziationsstudie in Analysegruppe 3.

| <b><i>TRAF1</i></b>        |                             |                       |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (N = 372)</b> | <b>Fälle (N = 92)</b> |
| A                          | 217                         | 57                    |
| G                          | 155                         | 35                    |
| AA                         | 65 (34,9 %)                 | 16 (34,8 %)           |
| AG                         | 87 (46,8 %)                 | 25 (54,3 %)           |
| GG                         | 34 (18,3 %)                 | 5 (10,9 %)            |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>  | <b>P</b>              |
| Allelfrequenzdifferenztest | 0,40                        | 0,527                 |
| Armitage-Trend-Test        | 0,40                        | 0,527                 |

Tab. 27: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  17,6 kPa).

Die Assoziation zwischen dem Genotyp des *TRAF1*-SNP und der Ausprägung einer fibrotischen Leberveränderung war bei der Untergruppe der Hepatitis C-Patienten statistisch nicht signifikant. Auch die Minorallelfrequenzen unterschieden sich in den Fall- und Kontrollgruppen nicht.

### 3.7.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie im Gesamtkollektiv ohne HCV-Patienten

Um den Effekt des *TRAF1*-SNP auf die Ausprägung der Leberfibrose zu überprüfen, wurde eine weitere Untergruppe, die das Gesamtkollektiv ohne Patienten mit Hepatitis C umfasste, gebildet. Im Folgenden die Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus im Gesamtkollektiv ohne HCV-Patienten.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                 |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 274) | Fälle (N = 136) |
| A                          | 149                  | 94              |
| G                          | 125                  | 42              |
| AA                         | 40 (29,2 %)          | 31 (45,6 %)     |
| AG                         | 69 (50,4 %)          | 32 (47,1 %)     |
| GG                         | 28 (20,4 %)          | 5 (7,3 %)       |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 8,18                 | 0,004           |
| Armitage-Trend-Test        | 8,35                 | 0,003           |
| Odds Ratio Statistik       | OR                   | 95 % C.I.       |
| [G]↔[A]                    | 1,878                | 1,216-2,900     |
| [GG]↔[AG]                  | 2,597                | 0,918-7,346     |
| [GG]↔[AA]                  | 4,340                | 1,502-12,538    |
| [AA+AG]↔[GG]               | 3,327                | 1,190-8,806     |

Tab. 28: Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei histologisch gesichertem Fibrosestatus (Kontrollen = F0-3, Fälle = F4). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

In diesem Falle ließ sich eine deutliche Signifikanz des Zusammenhangs zwischen Leberfibroseausprägung und *TRAF1*-Genotypen nachweisen. Die allelische OR bezogen auf das Risikoallel A betrug hier 1,878. Auch die Minorallelfrequenz unterschied sich deutlich zwischen den Patienten mit milder Fibrose und denen mit fortgeschrittener Fibrose (0,456 vs. 0,309, p = 0,004).

In Tabelle 29 Darstellung der Assoziationsstudie zu den Varianten in Analysegruppe 1.

| <b><i>TRAF1</i></b>         |                             |                        |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>     | <b>Kontrollen (N = 250)</b> | <b>Fälle (N = 106)</b> |
| A                           | 132                         | 69                     |
| G                           | 118                         | 37                     |
| AA                          | 33 (26,4 %)                 | 22 (41,5 %)            |
| AG                          | 66 (52,8 %)                 | 25 (47,2 %)            |
| GG                          | 26 (20,8 %)                 | 6 (11,3 %)             |
| <b>Assoziationstest</b>     | <b><math>\chi^2</math></b>  | <b>P</b>               |
| Allelfrequenzdifferenztest  | 4,58                        | 0,032                  |
| Armitage-Trend-Test         | 4,77                        | 0,029                  |
| <b>Odds Ratio Statistik</b> | <b>OR</b>                   | <b>95 % C.I.</b>       |
| [G]↔[A]                     | 1,667                       | 1,042-2,668            |
| [GG]↔[AG]                   | 1,641                       | 0,604-4,462            |
| [GG]↔[AA]                   | 2,889                       | 1,022-8,163            |
| [AA+AG]↔[GG]                | 2,057                       | 0,793-5,336            |

Tab. 29: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 1** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  7,0 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

Die allelische OR bezogen auf das Risikoallel ergab 1,667. Auch in diesem Subkollektiv konnte eine signifikante Assoziation zwischen Genotyp und Leberfibrosestatus festgestellt werden (p = 0,029).

Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse zur Verteilung der Allele und Genotypen bei Analysegruppe 2 im Kollektiv ohne die HCV-Patienten.

| <b><i>TRAF1</i></b>        |                             |                        |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <b>Allele/Genotypen</b>    | <b>Kontrollen (N = 342)</b> | <b>Fälle (N = 106)</b> |
| A                          | 189                         | 69                     |
| G                          | 153                         | 37                     |
| AA                         | 51 (29,8 %)                 | 22 (41,5 %)            |
| AG                         | 87 (50,9 %)                 | 25 (47,2 %)            |
| GG                         | 33 (19,3 %)                 | 6 (11,3 %)             |
| <b>Assoziationstest</b>    | <b><math>\chi^2</math></b>  | <b>P</b>               |
| Allelfrequenzdifferenztest | 3,20                        | 0,074                  |
| Armitage-Trend-Test        | 3,28                        | 0,070                  |

Tab. 30: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 2** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  12,5 kPa).

Hier ließ sich ähnlich wie im Gesamtkollektiv nur eine Tendenz zum Zusammenhang zwischen den untersuchten Merkmalen bei einem  $p = 0,07$  erkennen.

Nachstehend die Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3 im Gesamtkollektiv ohne die HCV-Patienten.

| <i>TRAF1</i>               |                      |                |
|----------------------------|----------------------|----------------|
| Allele/Genotypen           | Kontrollen (N = 342) | Fälle (N = 78) |
| A                          | 189                  | 54             |
| G                          | 153                  | 24             |
| AA                         | 51 (29,8 %)          | 18 (46,2 %)    |
| AG                         | 87 (50,9 %)          | 18 (46,2 %)    |
| GG                         | 33 (19,3 %)          | 3 (7,6 %)      |
| Assoziationstest           | $\chi^2$             | P              |
| Allelfrequenzdifferenztest | 5,08                 | 0,024          |
| Armitage-Trend-Test        | 5,21                 | 0,022          |
| Odds Ratio-Statistik       | OR                   | 95 % C.I.      |
| [G]↔[A]                    | 1,821                | 1,076-3,082    |
| [GG]↔[AG]                  | 2,276                | 0,629-8,237    |
| [GG]↔[AA]                  | 3,882                | 1,060-14,222   |
| [AA+AG]↔[GG]               | 2,870                | 0,832-9,891    |

Tab. 31: **Assoziationsstudie zu *TRAF1*. Allel- und Genotypverteilung bei Analysegruppe 3** (Kontrollen = Fibroscan  $\leq$  12,4 kPa, Fälle = Fibroscan  $\geq$  17,6 kPa). C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

Mit einem  $p = 0,022$  konnte man in dieser Analyse eine Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Leberfibrosegrad annehmen. Die allelische OR ergab 1,821 bezogen auf das Risikoallel A. Patienten mit dem homozygoten Genotyp [AA] hatten im Vergleich zum homozygoten Genotyp [GG] ein 3,9-fach erhöhtes Risiko, an einer schweren Leberfibrose zu erkranken.

Zusammenfassend konnte mit der statistischen Analyse die Hypothese, dass Varianten im *TRAF1*-Lokus einen Einfluss auf die Ausprägung der Leberfibrose haben, unterstützt werden. Dabei war im Gesamtkollektiv ein deutlicher Zusammenhang erkennbar, der in der Untergruppe der HCV-Patienten nicht nachweisbar war. In einer weiteren Subgruppe, die alle anderen Patienten (ohne eine Hepatitis C) einschloss, war der Effekt dagegen deutlich zu erkennen.

### 3.8 Regressionsanalysen

Mit Hilfe einer logistischen Regressionsanalyse sollte überprüft werden, ob die Assoziation der Leberfibrosestadien mit dem *TRAF1*-SNP einen unabhängigen Risikofaktor für die Leberfibrose darstellt. Dabei wurde zunächst eine univariate Analyse vorangestellt, um anschließend die dort signifikant assoziierten Faktoren in einer multivariaten Regressionsanalyse zu betrachten. Als Zielgröße wurde die binäre Variable „Milde/schwere Leberfibrose“ gewählt, definiert mithilfe der Histologie sowie der Fibroscaneinteilung nach Analysegruppe 3.

Als Kovariaten wurden folgende Parameter eingegeben:

- Alter
- Geschlecht
- BMI
- *TRAF1*-SNP
- Hauptdiagnose Alkoholabusus
- Hauptdiagnose HCV

Im Folgenden sind die Tabellen mit den Ergebnissen dargestellt, welche die in das Modell eingeschlossenen Variablen mit p-Werten und Odds Ratios enthalten. Dabei bedeuten p-Werte < 0,05, dass die entsprechende Variable einen Einfluss auf die Zielgröße hat. Die Odds Ratio gibt die Stärke des Zusammenhangs zwischen den Merkmalen an. Dieser Faktor bezieht sich auf die Zunahme pro Einheit bei stetigen Variablen bzw. auf die Änderung der Wahrscheinlichkeit gegenüber dem Grundzustand bei diskreten Merkmalen.

| <b>Univariate Regressionsanalyse</b> |           |                  |          |
|--------------------------------------|-----------|------------------|----------|
| <b>Faktor</b>                        | <b>OR</b> | <b>95 % C.I.</b> | <b>P</b> |
| Alter                                | 1,019     | 1,003-1,036      | 0,024    |
| Geschlecht                           |           |                  | 0,820    |
| BMI                                  |           |                  | 0,737    |
| <i>TRAF1</i>                         | 2,504     | 1,256-4,991      | 0,009    |
| Hauptdiagnose Alkohol                | 13,699    | 6,544-28,677     | <0,001   |
| Hauptdiagnose HCV                    | 0,631     | 0,411-0,968      | 0,035    |

| <b>Multivariate Regressionsanalyse</b> |           |                  |          |
|--|-----------|------------------|----------|
| <b>Faktor</b>                          | <b>OR</b> | <b>95 % C.I.</b> | <b>P</b> |
| <i>TRAF1</i>                           |           |                  | 0,096    |
| Hauptdiagnose Alkohol                  | 13,558    | 6,476-28,385     | <0,001   |
| Alter                                  |           |                  | 0,061    |
| Hauptdiagnose HCV                      |           |                  | 0,320    |

Tab. 32: **Regressionsanalyse im Bezug auf die Leberfibrose, definiert mit Hilfe der Histologie.** C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

In der Tabelle 32 ist die Regressionsanalyse im Bezug auf die Leberfibrose definiert durch die histologische Klassifikation, aufgeführt. Während in der univariaten Analyse der *TRAF1*-SNP noch signifikant einen Einfluss auf die Fibroseausprägung zu haben scheint, lässt sich dies in der multivariaten Analyse nicht bestätigen. Ein Trend ist jedoch erkennbar. Die Hauptdiagnose Alkoholabusus ist als Ursache für die Leberfibrose signifikant mit einer stärkeren Ausprägung der Fibrose assoziiert.

| <b>Univariate Regressionsanalyse</b> |           |                  |          |
|--------------------------------------|-----------|------------------|----------|
| <b>Faktor</b>                        | <b>OR</b> | <b>95 % C.I.</b> | <b>P</b> |
| Alter                                | 1,022     | 1,003-1,041      | 0,023    |
| Geschlecht                           |           |                  | 0,226    |
| BMI                                  |           |                  | 0,870    |
| <i>TRAF1</i>                         | 2,348     | 1,086-5,075      | 0,03     |
| Hauptdiagnose Alkohol                | 6,365     | 3,063-13,233     | <0,001   |
| Hauptdiagnose HCV                    |           |                  | 0,957    |

| <b>Multivariate Regressionsanalyse</b> |           |                  |          |
|--|-----------|------------------|----------|
| <b>Faktor</b>                          | <b>OR</b> | <b>95 % C.I.</b> | <b>P</b> |
| <i>TRAF1</i>                           | 2,468     | 1,109-5,494      | 0,027    |
| Hauptdiagnose Alkohol                  | 6,619     | 3,143-13,942     | <0,001   |
| Alter                                  |           |                  | 0,046    |

Tab. 33: **Regressionsanalyse im Bezug auf die Leberfibrose, definiert mit Hilfe des Fibroscans (Analysegruppe 3).** C.I. = Konfidenzintervall, OR = Odds ratio

In der Tabelle 33 sind die Regressionsanalysen zur Leberfibrose, hier definiert mit Hilfe des Fibroscans (Analysegruppe 3), dargestellt. Hier zeigt sich eine signifikante Assoziation des *TRAF1*-SNP mit der Leberfibroseausprägung; es ist zu beachten, dass hier Träger des A-Allels als Risikoallelträger definiert wurden. Wie auch bei der oben aufgeführten Analyse ist wieder der Alkoholabusus signifikant assoziiert. Alle weiteren Variablen hatten keinen Einfluss auf die Ausprägung der Leberfibrose.

## 4. Diskussion

Die Leberfibrose als Endstadium aller chronischen Lebererkrankungen ist eine multikausale komplexe Erkrankung (Siegmond et al., 2005). Die Entstehung der Fibrose unterliegt unabhängig von der Ätiologie der Lebererkrankung verschiedenen Faktoren (Guo et al., 2010), zudem weist die Fibroseprogression bei Patienten eine starke interindividuelle Variabilität auf. Frühere Arbeiten lassen einen Einfluss genetischer Varianten auf die Fibroseentstehung und den Krankheitsverlauf vermuten (Aguillón et al., 2006). Diese sind jedoch noch unzureichend charakterisiert, und bislang konnte auch erst eine limitierte Anzahl an Genloci, die die Fibrogenese beeinflussen, identifiziert werden. Ein allgemeines Risikogen für die Leberfibrose wurde noch nicht gefunden (Weber et al., 2010).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines Kandidatengenansatzes den Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Fibrorestadien und genetischen Varianten in den *DDX5*- und *TRAF1*-Genen zu untersuchen. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Fibroseausprägung und dem *DDX5*-SNP gefunden werden. Für den Einzelnukleotidpolymorphismus im *TRAF1*-Lokus hingegen konnte erstmals eine Assoziation mit der Ausprägung der Leberfibrose gezeigt werden. Hierbei hatten im Gesamtkollektiv homozygote Träger des Risikoallels ein 2,5-fach höheres Risiko, an einer schweren Fibrose zu erkranken. Dies konnte in der Subgruppe der HCV-Patienten nicht beobachtet werden, ließ sich jedoch in einer Analyse ohne HCV-infizierte Patienten noch deutlicher nachweisen.

Huang et al. (Huang et al., 2006) identifizierten die *DDX5*-Variante 2006 im Rahmen einer genomweiten Studie als Risikofaktor für eine gesteigerte Fibroseprogression bei chronischer Hepatitis C. Bereits in der nachfolgenden Studie von Huang et al. (Huang et al., 2007) konnte diese Assoziation jedoch nicht bestätigt werden, so dass ein wesentlicher Einfluss als unwahrscheinlich galt. Eine Studie zur Bedeutung von *DDX5* für die hepatischen Sternzellen wurde von Guo et al. 2010 veröffentlicht (Guo et al., 2010). Hierbei wurde dem p.S480A Polymorphismus des *DDX5*-Genlocus ein Einfluss auf die Fibrogenese zugeschrieben. Es konnte festgestellt werden, dass *DDX5* als Transkriptionsfaktor die Expression von TGF- $\beta$ 1 und weiteren profibrogene Genen unterdrückt. Die Variante des *DDX5*-SNP konnte im Gegensatz zum Wildtyp mit einer erhöhten fibrogenen Aktivität der hepatischen Sternzellen in Verbindung gebracht werden, was als Folge einer mangelnden Repression der profibrogenen Gene gewertet wurde (Guo et al., 2010). Dieser Zusammenhang zwischen verstärkter Leberfibrose und dem

Genotyp des *DDX5*-Polymorphismus ist allerdings nur an hepatischen Sternzelllinien untersucht worden. Damit wurde zwar ein Einfluss des Polymorphismus auf die Fibrogenese in den Sternzellen nachgewiesen, ein erhöhtes Risiko für Träger der *DDX5*-Variante, an einer fortgeschrittenen Leberfibrose zu erkranken, ist damit jedoch nicht belegt. Zusammenfassend decken sich damit unsere Ergebnisse mit der Literatur.

Als zweiter Einzelnukleotidpolymorphismus wurde in dieser Arbeit eine Variante des *TRAF1*-Gens untersucht. Die TRAF-Proteine sind wichtige Mediatoren in der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie, welche für die Aktivierung von TNF- $\alpha$  nötig sind (Potter et al., 2007). TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches bei Entzündungen ausgeschüttet wird. Das *TRAF1*-Gen liegt in enger Nachbarschaft zum *C5*-Gen, das für den Komplementfaktor *C5* kodiert (Hillebrandt et al., 2005). Das Komplementsystem spielt im Entzündungs- und Apoptoseprozess von Zellen eine wichtige Rolle. Die Fibrose ist Folge chronischer Entzündungsprozesse in einer geschädigten Leber, und Mutationen des *TRAF1/C5*-Genlocus sind bereits mit einem erhöhten Risiko für eine Leberfibrose sowie für die rheumatoide Arthritis in Verbindung gebracht worden (Amos et al., 2007; Hillebrandt et al., 2005; Kurreeman et al., 2007; Plenge et al., 2007). Hierbei muss man allerdings anmerken, dass ein sogenanntes Kopplungsungleichgewicht existiert. Dieses Phänomen beschreibt die nicht-zufällige Assoziation von Allelen, welche auf einer geringen Distanz zwischen Genloci auf dem Chromosom beruht. Durch das Kopplungsungleichgewicht kann eine genetische Variante mit einem Phänotypen assoziiert sein, für den jedoch nicht diese Variante selbst, sondern eine Variante in einem gekoppelten Genlocus verantwortlich ist (Wang et al., 2011). Dementsprechend ist es möglich, dass der in dieser Arbeit untersuchte SNP rs3761847 nicht funktionell für das erhöhte Fibrosierisiko verantwortlich ist, sondern ein mit diesem SNP im Kopplungsungleichgewicht stehender Polymorphismus.

Zur genauen Betrachtung des Gesamtkollektivs wurden mehrere Analysegruppen gebildet. Dabei wurde jeweils eine Kontrollgruppe mit einer Fallgruppe verglichen. In der histologischen Analysegruppe wurden Patienten mit histologisch gesicherter Fibrose in den Stadien F0-F3 als Kontrollen Zirrhosepatienten als Fälle gegenüber gestellt. Analysegruppe 1 betrachtete als Kontrollen Patienten mit Fibroscanwerten  $\leq 7,0$  kPa und als Fälle solche mit Fibroscanwerten  $\geq 12,5$  kPa. Bei Analysegruppe 2 wurden alle Patienten eingeschlossen (Kontrollgruppe Fibroscan  $\leq 12,4$  kPa vs. Fallgruppe Fibroscan  $\geq 12,5$  kPa), während in Analysegruppe 3 extreme Fibroscanwerte gewählt wurden (Kontrollen Fibroscan  $\leq 12,4$  kPa vs. Fallgruppe Fibroscan  $\geq 17,6$  kPa). Mit Hilfe dieser Einteilung konnte sowohl im Gesamtkollektiv als auch in einem

Kollektiv, in dem Hepatitis C-Patienten ausgeschlossen waren, eine Assoziation des *TRAF1*-Polymorphismus mit der fortgeschrittenen Leberfibrose nachgewiesen werden.

Im Gesamtkollektiv wurde eine signifikante Assoziation zwischen Fibroseausprägung und Polymorphismus des *TRAF1*-Gens gefunden (OR = 1,429, p = 0,039), wenn Patienten mit Lebersteifigkeiten zwischen 12,5 und 17,5 kPa ausgeschlossen wurden. Auch nach der histologischen Einschätzung der Fibrose konnte in der Gesamtkohorte eine signifikante Assoziation festgestellt werden. Die ermittelten Daten bestätigen den bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen der Leberfibroseausprägung und genetischer Variation im *TRAF1/C5*-Lokus. In dem Subkollektiv der Hepatitis C-Patienten zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Ausprägung der Leberfibrose und Genotyp des *TRAF1*-Genlocus. Wurde allerdings das Gesamtkollektiv ohne die Gruppe der HCV-infizierten Patienten betrachtet, konnte in fast allen Analysen eine Assoziation zwischen Fibrose und Genotyp nachgewiesen werden. Am deutlichsten ließ sich das bei den histologisch bzw. klinisch gesicherten Daten belegen (OR = 2,2, p < 0,001). Dass dieser Zusammenhang in der Subgruppe der Hepatitis C-Patienten nicht gefunden wurde, könnte verschiedene Ursachen haben. Zwar ist die Fibrogenese ein Prozess, der unabhängig der Krankheitsursache gleich verläuft, bei Hepatitis C-Patienten spielen aber viele weitere Faktoren, z.B. der Genotyp der Hepatitis C-Viren, eine Rolle für den Krankheitsverlauf.

Nachdem der Zusammenhang zwischen den SNPs und der Fibroseausprägung untersucht worden war, wurden mit Hilfe einer logistischen Regressionsanalyse weitere Einflussfaktoren auf die Fibroscanergebnisse getestet. Hierbei konnte außer dem bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im *TRAF1*-Lokus nur ein Einfluss des Alkoholkonsums auf die Schwere der Leberfibrose festgestellt werden. Dies steht nicht im Einklang mit der Literatur, welche - basierend auf großen Studien - neben dem Alkoholkonsum insbesondere Alter und Geschlecht als Risikofaktoren für eine fortgeschrittene Fibrose angibt (Wright et al., 2003).

Die Schwere der Leberfibrose wurde in dieser Arbeit durch transiente Elastographie ermittelt. Dadurch liegt hiermit eine der ersten genetischen Studien vor, die zur Beurteilung des Fibrosestatus der Patienten den Fibroscan heranziehen. Die Spezifität und Sensitivität des Fibroscans nimmt, wie auch bei anderen Verfahren einschließlich der Leberbiopsie, mit dem Fibrorestadium zu (Andersen et al., 2009). Zur elastographischen Differenzierung der Fibrorestadien gibt es in der Literatur unterschiedliche, teilweise konträre Angaben. So haben Carrion et al. (Carrión et al., 2006) sowie Castera et al. (Castera et al., 2005) einen Grenzwert des Fibroscans für die Zirrhose (F4 nach Desmet und Scheuer) bei 12,5 kPa angesetzt. Andere Autoren legen diesen höher, bei 13,0 kPa oder sogar 17,6 kPa (Erhardt et al., 2006; Foucher et al.,

2006; Ziol et al., 2005). Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Analysegruppen mit unterschiedlichen Grenzwerten gebildet. Zudem sind die Grenzwerte zur Zirrhose möglicherweise krankheitsspezifisch, allgemeine Grenzwerte für gemischte Populationen liegen nicht vor. Die ausgewählten Grenzwerte orientieren sich an großen vorangegangenen Studien, die wie unser Kollektiv entweder aus gemischten Patientenkollektiven (Foucher et al., 2006) oder aber hauptsächlich aus HCV-infizierten Patienten bestanden (Castera et al., 2005). Der Einfluss genetischer Varianten auf den untersuchten Phänotypen (hier die Fibroseausprägung) ist bei phänotypischen Extremen am wahrscheinlichsten, d.h. bei ausgeprägter Fibrose bzw. leichter Fibrose deutlicher sichtbar. Die Ergebnisse zum *TRAF1*-SNP bestätigen diese Annahme, da sich nur signifikante Ergebnisse in den Analysegruppen 1 und 3 finden, welche ebendiese phänotypischen Extreme abbilden. Das spricht auch für die von mehreren Autoren bereits erwähnte Grauzone in der Fibroscanmessung. In dieser ist es nicht eindeutig möglich, die mittelschweren Fibrosestufen von einander zu unterscheiden. Es ist empfohlen worden, in diesen Fällen weiterhin Leberbiopsien zu entnehmen (Stauber, 2009).

In dieser Arbeit wurde im Sinne eines Kandidatengenansatzes eine Patientenkohorte bezüglich zweier Einzelnukleotidpolymorphismen genotypisiert. Anschließend wurde ein Testkollektiv der Patienten mit ausgeprägter Leberfibrose mit einem Kontrollkollektiv der Patienten mit geringgradiger Fibrose verglichen. Man geht davon aus, dass genetische Unterschiede zwischen den menschlichen Populationen existieren (Cardon und Palmer, 2003). Um diese als Grund für die unterschiedliche Suszeptibilität auszuschließen, wurden ausschließlich Patienten mit kaukasischer Abstammung eingeschlossen. Außer dem fehlendem Einverständnis seitens des Patienten gab es keine Ausschlusskriterien für diese Studie. Dementsprechend hatten die Patienten verschiedene Grunderkrankungen und es wurden auch Patienten mit hepatisch relevanten Nebendiagnosen eingeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen den untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen und der Ausprägung der Leberfibrose betrachtet werden, d.h. es wurden genetische Häufigkeiten innerhalb verschiedener Kohorten verglichen. Damit handelt es sich um eine Querschnittsstudie. Dementsprechend kann jedoch mit diesen Daten keine Aussage über die Progression der Leberfibrose getroffen werden, hierzu würden Langzeitdaten benötigt. Auch konnte bei der Datenaufnahme die Krankheitsdauer nicht bei allen Patienten ermittelt werden, da diese in vielen Fällen nur schwer nachvollziehbar war. Dies lässt aber die Frage offen, in wie weit die Fibrosestadien von Patienten, die unterschiedlich lange von einer Lebererkrankung betroffen waren, miteinander verglichen werden können. So muss unter Umständen

davon ausgegangen werden, dass sich trotz des ungünstigen Einflusses der SNP-Varianten aufgrund des möglicherweise erst kurzen Krankheitsverlaufes noch keine höhergradige Fibrose ausgebildet hatte. Dies könnte Gegenstand weiterer Langzeitstudien werden.

Das Patientenkollektiv umfasste in dieser Studie 537 Patienten. Die Größe des Kollektivs war für eine statistisch verwertbare Aussage dementsprechend ausreichend, allerdings sind die Effekte vieler SNPs statistisch moderat. Insofern sind genetische Studien immer mit möglichst großen Patientenkohorten durchzuführen. Die hier durchgeführte kandidatengenbezogene Studie hat nicht den Anspruch einer genomweiten Studie, in die häufig mehrere tausend Patienten eingeschlossen werden. Vergleichbare kandidatengenbezogene Studien betrachten jedoch ähnlich große Patientenkollektive wie in dieser Arbeit (Kurreeman et al., 2007).

Das Ziel genetischer Studien ist es, ein besseres Verständnis von Krankheitsursachen und -verläufen zu erlangen. Es galt hier, Patienten mit erhöhtem Fibrosierisiko und solchen mit geringerem Risiko für eine rasche Fibroseprogression zu unterscheiden. Da jedoch klinische und histologische Risikoscores vielfach keine genauen Aussagen zulassen, könnten zukünftig polygene Risikoscores an Bedeutung gewinnen (Hardy und Singleton, 2009). Aufgrund der vorliegenden Arbeit könnte der Einzelnukleotidpolymorphismus des *TRAF1*-Gens bei der Beurteilung des Fibrosierisikos mit Hilfe solcher Scores Berücksichtigung finden.

## 5. Zusammenfassung

Die Leberfibrose ist, unabhängig der Ätiologie, die gemeinsame Endstrecke aller chronischen Lebererkrankungen. Sie führt schließlich zur Leberzirrhose und kann in ein hepatozelluläres Karzinom oder ein chronisches Leberversagen münden, wodurch sie sowohl von großer klinischer als auch gesundheitsökonomischer Relevanz ist. Trotz langjähriger Schädigung der Leber schreitet die Fibrose bei vielen Patienten aufgrund der Regenerationskapazität der Leber nur relativ langsam voran. Die Progression weist beim Menschen allerdings eine interindividuelle Variabilität auf. Diese Unterschiede sind von Alter, Geschlecht und exogenen Faktoren wie Koinfektion oder Alkoholkonsum abhängig. Zudem können genetische Faktoren die hepatische Fibrose modulieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen den beiden Einzelnukleotidpolymorphismen p.S480A im *DDX5*-Gen und rs3761847 im *TRAF1*-Lokus und der Ausprägung der fibrotischen Lebererkrankung, welche mithilfe der transienten Elastographie quantifiziert wurde, zu untersuchen. *DDX5* als Koaktivator des p68 und *TRAF1* als Aktivator des TNF-Rezeptors beeinflussen vielfältige Entzündungsprozesse in der Leber.

In der vorgelegten Arbeit wurde eine Patientenkohorte (n = 537) bezüglich dieser beiden Einzelnukleotidpolymorphismen genotypisiert. Anschließend wurde die Gruppe der Patienten mit ausgeprägter Leberfibrose mit den Patienten mit geringgradiger Fibrose verglichen. Dabei konnte keine Assoziation zwischen dem *DDX5*-Polymorphismus und einem erhöhten Fibrosierisiko festgestellt werden. Der *TRAF1*-Polymorphismus zeigte dagegen eine signifikante Assoziation, so dass ein Einfluss auf die Fibrogenese und ein erhöhtes Progressionsrisiko bei den Trägern des häufigeren Risikoallels anzunehmen ist. Diese Beobachtung könnte für die Entwicklung von genetischen Risikoscores zur Abschätzung der Fibroseprogression hilfreich sein.

## 6. Literaturverzeichnis

Aguillón JC, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C, Cuchacovich M. Could SNPs affecting the TNF-promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology* 2006; 211: 75-84

Aichinger E, Grimm T. 100 Jahre Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. *medgen* 2008; 20: 276–281

Andersen ES, Christensen PB, Weis N. Transient elastography for liver fibrosis diagnosis. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 339–342

Bahr M. Nichtinvasive Leberfibrosebestimmung. *Med Welt* 2009; 60: 137–142

Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218

Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AM, Bourdon JC, Wardrop J, Gregory DJ, Lane DP, Perkins ND, Fuller-Pace FV. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J* 2005; 24: 543-553

Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, Kluck C, Bässmann I, Brosch M, Lammert F, Miquel JF, Nervi F, Wittig M, Roszkopf D, Timm B, Höll C, Seeger M, ElSharawy A, Lu T, Egberts J, Fändrich F, Fölsch UR, Krawczak M, Schreiber S, Nürnberg P, Tepel J, Hampe J. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet* 2007; 39: 995-999

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003; 361: 598–604

Carrión JA, Navasa M, Bosch J, Bruguera M, Gilibert R, Forns X. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1791-1798

Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédinghen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343–350

Das SK, Vasudevan DM. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 260-269

Day CP. Genetic studies to identify hepatic fibrosis genes and SNPs in human populations. *Methods Mol Med* 2005; 117: 315-331

- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520
- Erhardt A, Lörke J, Vogt C, Poremba C, Willers R, Sagir A, Häussinger D. Transient elastography for diagnosing liver cirrhosis. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 2765-2769
- Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Lédinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403-408
- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 425-436
- Friedman SL. Hepatic fibrosis- Overview. *Toxicology* 2008 a; 254: 120-129
- Friedman SL. Liver fibrosis- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38: 38-53
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008 b; 134: 1655-1669
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008; 134: 960-974
- Friedrich-Rust M, Wunder K, Kriener S, Sotoudeh F, Richter S, Bojunga J, Herrmann E, Poynard T, Dietrich CF, Vermehren J, Zeuzem S, Sarrazin C. Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. *Radiology*. 2009; 252: 595-604
- Friedrich-Rust M, Zeuzem S. Nicht invasive Beurteilung des Leberfibrosestadiums mit der transienten Elastografie (Fibroscan): Aktueller Stand und Perspektiven. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 387-394
- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007; 47: 598-607
- Grünhage F, Lammert F. Assessment of hepatic fibrosis in chronic viral hepatitis. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, Hrsg. *Hepatology. A clinical textbook*. [www.hepatologytextbook.com](http://www.hepatologytextbook.com) 2009: 291-300
- Grünhage F, Nattermann J. Viral hepatitis: human genes that limit infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010; 24: 709-723

- Guo J, Hong F, Loke J, Yea S, Lim CL, Lee U, Mann DA, Walsh MJ, Sninsky JJ, Friedman SL. A *DDX5* S480A polymorphism is associated with increased transcription of fibrogenic genes in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 5428–5437
- Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med* 2009, 360: 1759-1768
- Helmholtz-Institut, 2012: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (Zugriffsdatum: 14.03.2011)
- Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Schirin-Sokhan R, Wilkens G, Geier A, Lorenzen J, Köhl J, Gressner AM, Matern S, Lammert F. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 2005; 37: 835-843
- Huang H, Shiffman ML, Cheung RC, Layden TJ, Friedman SL, Abar OT, Yee L, Chokkalingam AP, Schrodi SJ, Chan J, Catanese JJ, Leong DU, Ross D, Hu X, Monto A, McAllister LB, Broder S, White T, Sninsky JJ, Wright TL. Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 1679-1687
- Huang H, Shiffman ML, Friedman SL, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. A 7 Gene Signature Identifies the Risk of Developing Cirrhosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 297-306
- Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro Migratory Potential of Rat Quiescent Hepatic Stellate Cells and Its Augmentation by Cell Activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760-1767
- Knittel T, Saile B, Ramadori G. Fibrogenese. Pathophysiology and therapeutic approaches. *Internist* 1998; 39: 238-246
- Krawczyk M, Grünhage F, Zimmer V, Lammert F. Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 299-306
- Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, van der Helm-van Mil AH, Allaart CF, Verduyn W, Houwing-Duistermaat J, Alfredsson L, Begovich AB, Klareskog L, Huizinga TW, Toes RE. A candidate gene approach identifies the *TRAF1/C5* region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 2007; 4: 1515-1524
- Lane D. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16
- Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Dtsch Arztebl* 2007; 104: 1752-1757

Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 417-426

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215

Myers RP, Fong A, Shaheen AA. Utilization rates, complications and costs of percutaneous liver biopsy: a population-based study including 4275 biopsies. *Liver Int* 2008; 28: 705-712

Neubauer K, Knittel T, Armbrust T, Ramadori G. Accumulation and cellular localisation of fibrogen/fibrin during short term and long term rat liver injury. *Gastroenterology* 1995; 108: 1124-1135

Petz D, Klauck S, Röhl FW, Malferttheiner P, Roessner A, Röcken C. Feasibility of histological grading and staging of chronic viral hepatitis using specimens obtained by thin-needle biopsy. *Virchows Arch* 2003; 442: 238-244

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416

Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 281-290

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. *TRAF1-C5* as a Risk Locus for Rheumatoid Arthritis - A Genomewide Study. *N Engl J Med* 2007; 357: 1199-1209

Potter C, Eyre S, Cope A, Worthington J, Barton A. Investigation of association between the TRAF family genes and RA susceptibility. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1322-1326

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832

Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann W. Leberzirrhose- Teil 1: Pathogenese und Diagnostik. *Dtsch Med Wschr* 2001; 126: 975- 978

Rahman MM, McFadden G. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathog* 2006; 2: 66-77

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. In: *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Urban und Fischer, 2004

Rizzo L, Calvaruso V, Cacopardo B, Alessi N, Attanasio M, Petta S, Fatuzzo F, Montineri A, Mazzola A, L'abbate L, Nunnari G, Bronte F, Di Marco V, Craxì A, Cammà C. Comparison of Transient Elastography and Acoustic Radiation Force Impulse for Non-Invasive Staging of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2112-2120

Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003; 37: 4-12

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-1465

Roulot D, Czernichow S, Le Clésiau H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: Influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol* 2008; 48: 606-613

Rössler OG, Hloch P, Schütz N, Weitzenegger T, Stahl H. Structure and expression of the human p68 RNA helicase gene. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 932-939

Sandrin L, Catheline S, Tanter M, Hennequin X, Fink M. Time-resolved pulsed elastography with ultrafast ultrasonic imaging. *Ultrason Imaging* 1999; 21: 259-272

Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13: 372-374

Schirmacher P, Fleig WE, Dieners HP. Bioptische Diagnostik der chronischen Hepatitis-Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten und des Kompetenznetzes Hepatitis. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 175-185

Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis* 2005; 23: 264-274

Statistisches Bundesamt, 1998: Gesundheitsbericht für Deutschland. [http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc\\_tab?fid=937&suchstring=&query\\_id=&sprache=D&fund\\_typ=TX T&methode=&vt=&verwandte=1&page\\_ret=0&seite=1&p\\_lfd\\_nr=2&p\\_news=&p\\_sprachkz=D &p\\_uid=gast&p\\_aid=84455403&hlp\\_nr=2&p\\_janein=J](http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=937&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TX T&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=2&p_news=&p_sprachkz=D &p_uid=gast&p_aid=84455403&hlp_nr=2&p_janein=J) (Zugriffsdatum: 10.03.2010)

Statistisches Bundesamt, 2010: Gesundheitsberichterstattung. [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/365407090/39332131](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/365407090/39332131) (Zugriffsdatum: 10.03.2010)

Stauber R. Nichtinvasive Diagnose der Leberfibrose bei chronischen Hepatopathien. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 2009; 7: 12-17

Taouli B, Ehman RL, Reeder SB. Advanced MRI methods for assessment of chronic liver disease. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 193: 14-27

Terjung B, Lemnitzer I, Dumoulin FL, Effenberger W, Brackmann HH, Sauerbruch T, Spengler U. Bleeding complications after percutaneous liver biopsy. An analysis of risk factors. *Digestion* 2003; 67: 138-145

Thierfelder W, Hellenbrand W, Meisel H, Schreier E, Dortschy R. Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 429-435

Török N. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2008; 43: 315-321

Treutlein J, Schumann G. Kandidatengenbasierte genetische Assoziationsstudien bei Alkoholabhängigkeit. *Psychoneuro* 2005; 31: 576-579

Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60

Van der Poorten D, Kwok A, Lam T, Ridley L, Jones DB, Ngu MC, Lee AU. Twenty-year audit of percutaneous liver biopsy in a major Australian teaching hospital. *Intern Med J* 2006; 36: 692-699

Wang L, Jia P, Wolfinger RD, Chen X, Zhao Z. Gene set analysis of genome-wide association studies: methodological issues and perspectives. *Genomics* 2011; 98: 1-8

Wasmuth H, Trautwein C. Leberfibrose- Klinik, Diagnostik und Management. *Internist* 2009; 1-7

Weber S, Grünhage F, Hall R, Lammert F. Genomweite Assoziationsstudien in der Hepatologie. *Z Gastroenterol* 2010; 48: 56-64

Wicovsky A, Henkler F, Salzmann S, Scheurich P, Kneitz C, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 2009; 28: 1769-1781

Wright M, Goldin R, Fabre A, Lloyd J, Thomas H, Trepo C, Pradat P, Thursz M. Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut* 2003; 52: 574-579

Zill P, Ackenheil M, Rietschel M, Maier W. Molekulare Genetik affektiver Störungen: Befunde und Strategien zur Identifikation der genetischen Ursachen. *Psychoneuro* 2003; 29: 51-56

Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédighen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54

## **7. Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. med. F. Lammert sehr herzlich.

Herrn PD Dr. med. F. Grünhage, der mir mit Rat und Tat bei den experimentellen Untersuchungen und der Betreuung der gesamten Arbeit half, gilt mein großer Dank.

Für den fachlichen Rat in Fragen der statistischen Bearbeitung der Daten danke ich Herrn PD Dr. M. Knapp, Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn.

Für die Unterstützung meiner Eltern, auf die ich immer bauen konnte, danke ich ihnen zutiefst.