

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss der Hämochromatose (*HFE*)-Gen-Varianten auf
die Progression chronischer Lebererkrankungen und die
Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Richard Waluga

aus Krefeld

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Puhl
2. Prof. Dr. med. H. U. Schulz
3. Prof. Dr. med. H. Lochs

Datum der Promotion: 27.03.2009

Meinen lieben Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Genetische Faktoren in der Krankheitsätiologie</i>	1
1.2	<i>Genetik</i>	3
1.2.1	Genvariationen	3
1.2.2	Genetische Risikofaktoren der hepatischen Fibrogenese	4
1.2.3	Genetische Risikofaktoren, die mit dem hepatozellulären Karzinom assoziiert sind	5
1.3	<i>HFE-Gen-Varianten</i>	6
1.3.1	Historisches und genetische Grundlagen	6
1.3.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	8
1.3.3	Pathophysiologie der Eisenakkumulation	9
1.4	<i>Chronische Lebererkrankungen</i>	11
1.4.1	Epidemiologie und Ätiologie	11
1.4.2	Leberzirrhose	13
1.4.3	Leberzellschäden durch Eisen	14
1.5	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>	14
1.5.1	Definition und Epidemiologie	14
1.5.2	Ätiologie	15
1.5.3	Molekulare Pathogenese	16
1.6	<i>Fragestellung</i>	17
2	Patienten und Methoden	19
2.1	<i>Patienten</i>	19
2.1.1	Patientenerhebung	19
2.1.2	Klinische und demographische Patientendaten	19
2.1.3	Klinisch-chemische Parameter	19
2.1.4	Histologische Untersuchung/Fibrosegrad-Bestimmung	20
2.1.5	Diagnosekriterien	21
2.1.5.1	Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom	21
2.1.5.2	Autoimmunhepatitis	21

2.1.5.3	Alkoholtoxische Lebererkrankung	22
2.1.5.4	Chronische Hepatitis B- und C-Virusinfektion	22
2.1.5.5	Kryptogene Lebererkrankung.....	22
2.1.5.6	Nichtalkoholische Fettleberhepatitis.....	22
2.1.5.7	Cholestatische Lebererkrankungen	23
2.2	<i>Kontrollgruppe</i>	23
2.3	<i>Materialien</i>	23
2.3.1	Geräte	23
2.3.2	Reagenzien, Enzyme, Puffer, Primer und Sonden.....	24
2.3.3	Verbrauchsmaterialien	24
2.4	<i>Methoden</i>	24
2.4.1	Extraktion der genomischen DNA	24
2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion	25
2.4.3	LightCycler-Technik	26
2.4.4	Nachweis der <i>HFE</i> -Gen-Varianten.....	28
2.5	<i>Statistische Verfahren</i>	30
3	Ergebnisse	31
3.1	<i>Untersuchtes Patientenkollektiv</i>	31
3.1.1	Demografische Daten und Diagnosegruppen	31
3.1.1	Patienten mit Zirrhose, Lebertransplantation und HCC.....	33
3.2	<i>Häufigkeitsverteilung der HFE-Gen-Varianten</i>	34
3.2.1	Häufigkeitsverteilung der C282Y-Variante	34
3.2.2	Häufigkeitsverteilung der H63D-Variante	34
3.3	<i>Einfluss des HFE-Genstatus auf den Schweregrad der Erkrankung</i>	36
3.3.1	Genotypverteilung in Abhängigkeit des Fibrosegrads	36
3.3.2	Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Zirrhose	37
3.3.1	Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Lebertransplantation.....	40
3.4	<i>Gesonderte Betrachtung der deutschen Patienten mit HCV-Infektion</i>	42
3.4.1	Häufigkeitsverteilung der <i>HFE</i> -Gen-Varianten	42
3.4.2	Einfluss des <i>HFE</i> -Genstatus auf den Schweregrad der Erkrankung.....	43
3.4.2.1	Genotypverteilung in Abhängigkeit des Fibrosegrads.....	43

3.4.2.2	Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Zirrhose/LTX	43
3.5	<i>Einfluss des HFE-Gen-Status auf die Entwicklung eines HCC</i>	44
4	Diskussion	48
4.1	<i>Einfluss der HFE-Gen-Varianten auf die Entwicklung und Progression chronischer Lebererkrankungen.....</i>	49
4.1.1	Gesamtkollektiv	49
4.1.2	Patienten mit Autoimmunhepatitis.....	49
4.1.3	Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung.....	50
4.1.4	Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virusinfektion.....	51
4.1.5	Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion.....	52
4.1.6	Patienten mit kryptogener Lebererkrankung	57
4.1.7	Patienten mit nichtalkoholischer Fettleberhepatitis	58
4.1.8	Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung	59
4.2	<i>Einfluss der HFE-Gen-Varianten auf die Entwicklung eines HCC.....</i>	60
4.3	<i>Problematik genetischer Studien.....</i>	62
4.3.1	Haplotypen	62
4.3.2	Umweltfaktoren	63
4.3.3	Ethnizität	63
4.3.4	Vergleichbarkeit von Studien.....	64
4.4	<i>Schlussfolgerung.....</i>	64
5	Zusammenfassung.....	67
6	Literatur.....	69
7	Danksagung.....	78
8	Lebenslauf	79
9	Erklärung.....	80

II. Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AIH	Autoimmunhepatitis
ALD	„alcoholic liver disease“
ALDH	Aldehydehydrogenase
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinucleäre Antikörper
ANCA	Antineutrophile-cytoplasmatische Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
C	Cystein
CLD	„cryptogenic liver disease“
CCR5	Chemokin(C-C Motiv)-Rezeptor 5
CD	„cluster of differentiation“
CT	Computertomographie
CTLA-4	„cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4“
CYP	Cytochrom P450
D	Asparaginsäure
DMT1	divalenter Metallionen-Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	„fluorescence resonance energy transfer“
γ -GT	gamma-Glutamyltransverase
H	Histidin
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus-Infektion
HFE	„hemochromatosis Feder“
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin-1

i.S.	im Serum
i.v.	intra-venös
LDL	Lipopolysaccharid
LKM	„liver-kidney-microsomes“
LP	Leber-Pankreas-Antigen
LTX	Lebertransplantation
Mb	Megabasen
MCP-1	„monocyte chemotactic protein-1“
MEOS	mikrosomales Ethanoloxidierendes System
MHC	“major histocompatibility complex”
MLP	Muskel-LIM-Protein (-Gen)
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MRT	Magnetresonanztomographie
NAFLD	“nonalcoholic fatty liver disease”
NASH	“nonalcoholic steatohepatitis”
OMIM	“online Mendelian Inheritance in Man”
PBC	primär biliäre Zirrhose
PCR	“polymerase chain reaction“
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
S	Serin
SLA	„soluble liver-antigen“
SMA	„smooth muscle-antigen“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
TAP2	Transporter 2
TGF	„transformic growth factor“
TNF	Tumornekrosefaktor
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase (-Gen)
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Genetische Faktoren in der Krankheitsätiologie

Ein Teil der genetischen Erkrankungen wird durch Mutationen eines einzigen Gens bedingt und nach den Mendelschen Gesetzmäßigkeiten vererbt (z.B. Mukoviszidose, Phenylketonurie). Ein weitaus größerer Teil von Erkrankungen wird nicht durch Mutationen eines einzigen Gens, sondern durch das Zusammenspiel verschiedener genetischer Alterationen in unterschiedlichen Genen verursacht. Darüber hinaus existieren klinische Erscheinungsbilder, die erst durch Interaktionen genetischer und nicht genetischer Faktoren zustande kommen, und die daher als multifaktoriell zu werten sind. Die nicht genetischen Faktoren werden allgemein als Umweltfaktoren bezeichnet, schließen genau genommen aber auch stochastische und epigenetische Faktoren mit ein.

Bei multifaktoriellen Erkrankungen ist der Prozentsatz von Trägern einer bestimmten Genvariante, die im Laufe ihres Lebens erkranken, häufig geringer als bei monogenen Erkrankungen, für die häufig die Penetranz bekannt ist, das heißt also die Wahrscheinlichkeit, mit der es zur Krankheitsausprägung kommt. Daher werden zur Beschreibung einer multifaktoriellen Erkrankung die Begriffe Suszeptibilität oder Disposition verwendet. Die Disposition kann dabei auf einem oder auch mehreren Genotypen beruhen, die erst unter bestimmten Umweltbedingungen zu funktionellen Störungen führen.

Auch die Leberfibrose bei chronischen Lebererkrankungen und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) können als multifaktorielle Erkrankungen betrachtet werden, deren natürlicher Verlauf abhängig ist von exogenen Faktoren (z.B. Virusinfektion, Alkoholkonsum), aber auch von der Kombination verschiedener veränderter Gene, welche bei der Interaktion mit der Umwelt eine Schlüsselrolle spielen.

Im Rahmen der hepatischen Fibrogenese spielen Mediatoren des Immunsystems, des Metabolismus sowie der Zellregulation eine wesentliche Rolle. Prinzipiell unterliegt jeder Schritt, von der ersten hepatozellulären Schädigung, über die komplexe Aktivierung und Transdifferenzierung von Sternzellen bis hin zur Ausbildung der Leberzirrhose, einer

komplexen genetischen Kontrolle (Bataller *et al.*, 2003). In den letzten Jahren wurden genetische Varianten einiger Kandidatengene hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Fibrogenese der Leber untersucht (Abbildung 1).

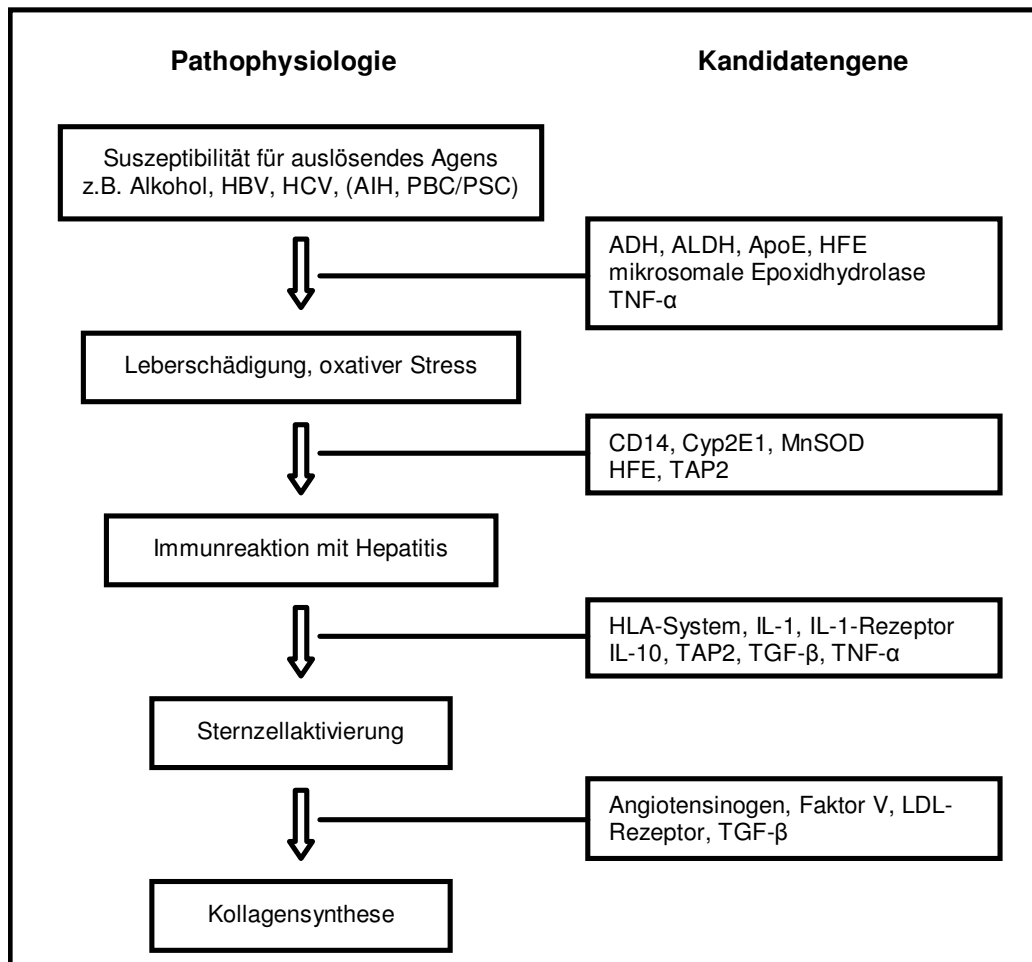


Abbildung 1: Pathophysiologie der Leberfibrose und Angriffspunkte möglicher profibrogener Kandidatengene (Bataller *et al.*, 2003)

Varianten dieser Gene können dabei für erhebliche Unterschiede bezüglich der Progression einer Leberzirrhose verantwortlich sein. Darin wird unter anderem eine Ursache für die unterschiedlich starke Progression der Lebererkrankung bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion gesehen (Poynard *et al.*, 1997). In Abbildung 2 sind die Verlaufsmöglichkeiten der Leberzirrhose bei chronischen Lebererkrankungen schematisch dargestellt.

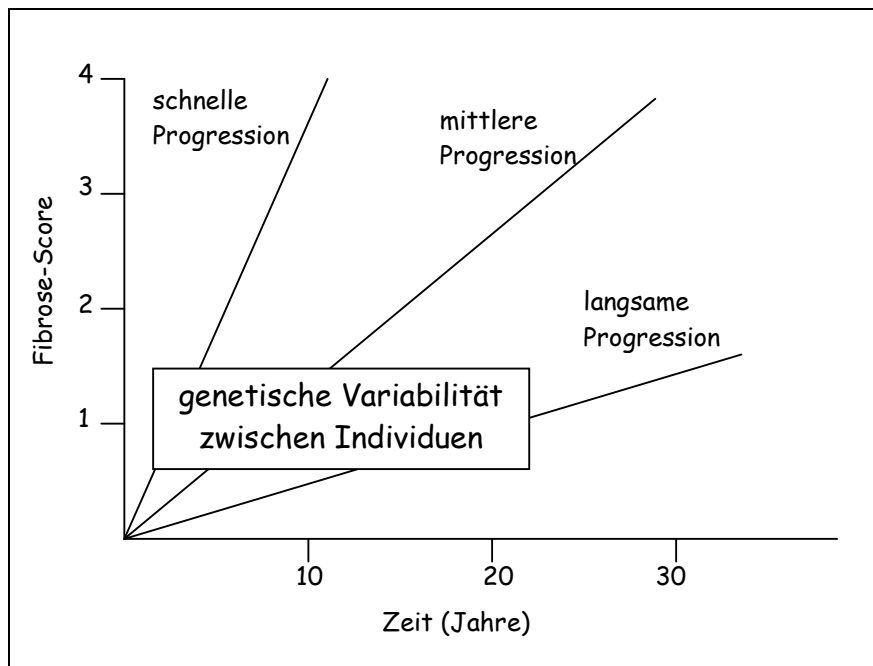


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Verlaufsmöglichkeiten der Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

Das Verständnis des Beitrags genetischer Faktoren zur Ätiologie und Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

1.2 Genetik

1.2.1 Genvariationen

Es ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl der für bestimmte Erkrankungen prädisponierenden genetischen Merkmale durch eine Kombination verschiedener Variationen (Synonyme: Varianten, Alterationen) in unterschiedlichen Genen vermittelt wird.

Die häufigste Form der Genvariation ist der so genannte „single nucleotide polymorphism“ (SNP), bei dem es zum Austausch eines Nukleotids im DNA-Molekül kommt. Liegt ein SNP im kodierenden Bereich einer Gen-Sequenz, kann das einen Aminosäureaustausch im resultierenden Protein zur Folge haben.

Bestimmte Genvariationen können in verschiedenen Populationen unterschiedliche Häufigkeiten aufweisen. Ein Basenaustausch in einem bestimmten Gen kann in einer Population als Mutation und in einer anderen als Genvariation gelten. Im Allgemeinen beschreibt der Begriff Mutation ein seltenes Merkmal mit einer Allelfrequenz von unter 1% oder ein spontanes *de novo* Ereignis, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Erkrankung führt, während eine Genvariation sich mit einer hohen Allelfrequenz von über >1% im Erbgut einer Population befindet und eine geringe Penetranz besitzt.

Schätzungsweise 50 000 – 250 000 Genvariationen, von denen die meisten in oder in der Nähe der etwa 30 000 Gene liegen, haben einen biologischen Effekt (Risch, 2001). Sie bilden die molekulare Grundlage für die meisten phänotypischen Unterschiede zwischen Individuen und können erklären, warum sich die gleichen Umweltfaktoren auf verschiedene Menschen unterschiedlich auswirken.

1.2.2 Genetische Risikofaktoren der hepatischen Fibrogenese

Eine Übersicht über einige bisher beschriebene mit der Leberzirrhose assoziierte Genvarianten gibt Tabelle 1:

Tabelle 1: Übersicht über die bisher mit der Leberfibrose assoziierten Genvarianten und Mutationen (Wasmuth *et al.*, 2003; Bataller *et al.*, 2003).

Kandidatengen	Proteinfunktion	Genvariante	Effekt auf Protein	Effekt auf Fibrogenese	Lebererkrankung
ADH2/3	Ethanolmetabolismus	ADH2 c1, c2, c3 Allele ADH3 c1, c2, c3 Allele	Aktivität ↑	Variabel	Alkoholinduziert
ALDH2	Ethanolmetabolismus	ALDH2 c2/c2 Allel	Abnormale Funktion	+	Alkoholinduziert
Angiotensinogen	Sternzellaktivierung	-6 G → A	Transkription ↑	+	HCV-Infektion
α ₁ -Antitrypsin	Proteinaseinhibitor	PiZ		+	Alkoholinduziert, kryptogen?
ApoE	Lipoproteinrezeptor? Rezeptor für Viren?	ε4 Allel	Abnormale Funktion	+	HCV-Infektion, PBC
CCR5	Chemokinrezeptor	Δ32		- (?)	HCV-Infektion
CD14	LPS-Rezeptor	-159 C → T	Transkription ↑	+	Alkoholinduziert
CTLA-4	Immunantwort	-66 A → G	Transkription ↑	+	Alkoholinduziert
Cyp2E1	Ethanolmetabolismus	c1/c2, c2/c2 Allele	Aktivität ↑	+	Alkoholinduziert
Faktor V	Gerinnungssystem	Faktor V Leiden		+	HCV-Infektion
HFE	Eisenmetabolismus, Eisenaufnahme	845 G → A (C282Y) 187 C → G (H63D)	Abnormale Funktion	+	Hämochromatose, HCV-Infektion, NASH
HLA-II Haplotypen	Immunantwort	verschiedene Allele	Variabel	Variabel	HCV-Infektion, PBC Alkoholinduziert,
IL-1β	Zytokin, pro- inflammatorisch	-3953 T → C -511 C → T	Sekretion ↑	+	Alkoholinduziert, PBC
IL-1-Rezeptor	Immunsystem, pro- inflammatorisch	VNTR Intron 2	Transkription ↑	+	Alkoholinduziert, PBC
IL-10	Zytokin, anti- inflammatorisch	-627 C → A	Transkription ↓	+	Alkoholinduziert, HCV-Infektion
LDL-Rezeptor	Fettstoffwechsel, Lipoproteinrezeptor	Exon 8 T370A		+	HCV-Infektion
MCP-1	Chemokin	-251 A → G		+	HCV-Infektion
Mikrosomale Epoxidhydrolase	Biotransformation	-613 C → T, Exon 3	Abnormale Funktion, Transkription ↓	+	HCV-Infektion
MnSOD	Antioxidant	1183 C → T	Abnormale Funktion	+	Alkoholinduziert
Myeloperoxidase	Oxidativer Stress	-463 G → A		+	HCV-Infektion
Endotheliale NO- Synthetase	Vasodilatation	-786 T → C -894 G → T		+	PBC
TAP2	Immunantwort	0201 Allel	Abnormale Funktion	+	Alkoholinduziert
TNF-α	Zytokin, pro- inflammatorisch	-308 G → A -238 G → A	Transkription ↑	+	HCV-Infektion, PBC Alkoholinduziert,
TGF-β	Zytokin, Sternzellaktivierung	Codon 10, Codon 25	Produktion ↑	+	HCV-Infektion

1.2.3 Genetische Risikofaktoren, die mit dem hepatozellulären Karzinom assoziiert sind

Als Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC müssen unter anderem auch Genvarianten und Mutationen in metabolischen Enzymen angesehen werden, die in der Leberzelle Aufgaben der Aktivierung und Detoxifikation von Mutagenen übernehmen

(Tabelle 2).

Tabelle 2: Auswahl von Genvarianten und Mutationen, die mit dem HCC assoziiert sind.

Kandidatengen	Proteinfunktion	Genvariante, Mutation	Effekt auf Protein	Effekt auf HCC	Lebererkrankung
<i>HFE</i> (Fargion <i>et al.</i> , 2001; Fracanzani <i>et al.</i> , 2005; Willis <i>et al.</i> , 2005)	Eisenmetabolismus, Eisenaufnahme	845 G → A (C282Y) 187 C → G (H63D)	Abnormale Funktion	+ (?)	HCV, HBV, Alkohol, Hämochromatose
CYP2E1 (Lee <i>et al.</i> , 1997)	Ethanolmetabolismus	c1/c2, c2/c2 Allele	Aktivität ↑	variabel	Alkohol
CYP1A1 (Yu <i>et al.</i> , 1995)	Biotransformation	MspI Ile-Val		+	Rauchen
UGT1A7 (Vogel <i>et al.</i> , 2001)	Detoxifikation	UGT1A7*3-Allel	Aktivität ↓	+	verschiedene
p53 (Yu <i>et al.</i> , 1999)	Tumor Suppressor Gen	Pro-Allel an Codon 72		+	verschiedene
TGF-β1 (Kim <i>et al.</i> , 2003)	Sternzellaktivierung	-509 C → T L10P		-	bei HBV
IL-10 (Shin <i>et al.</i> , 2003)	Zytokin, anti-inflammatorisch	IL-10-haplotyp2	Transkription ↑	+	HBV
Epoxid-Hydrolase (McGlynn <i>et al.</i> , 1995)	Detoxifikation			+	Aflatoxin B1
Gluthation S-Transferase M1 (McGlynn <i>et al.</i> , 1995)	Detoxifikation			+	Aflatoxin B1
MnSOD (Sutton <i>et al.</i> , 2006)	antioxidatives Enzym	Ala/Val-MnSOD Pro/Leu-GPx1		+	Alkohol

1.3 *HFE*-Gen-Varianten

1.3.1 Historisches und genetische Grundlagen

1976 wurde durch Simon *et al.* erstmals der Verdacht geäußert, dass es sich bei der Hämochromatose, einer behandelbaren Eisenspeicherkrankheit, um eine genetische Erkrankung handelt (Simon *et al.*, 1976). Er vermutete eine Assoziation des verursachenden Gens mit den Histokompatibilitätsantigenen HLA („Human Leucocyte

Antigene“-A3 und -B14. Daher wurde anfangs das Hämochromatose-Gen dem MHC („Major Histocompatibility Complex“) zugerechnet und als *HLA-H-Gen* bezeichnet.

Im Jahre 1996 konnten Feder *et al.* auf dem kurzen Arm des Chromosom 6, 3 Mb telomerisch zum MHC, das krankheitsrelevante Gen klonieren (Feder *et al.*, 1996). Zunächst wurde es weiterhin als HLA-H-, später dann als *HFE-Gen* bezeichnet. Es wurden 2 Punktmutationen dieses Gens (C282Y, OMIM #235200.0001 und H63D, OMIM #235200.0002) identifiziert. Bei der C282Y-Variante resultiert ein Nukleotidaustausch an Position 845 von Guanin zu Adenin in einen Aminosäureaustausch von Cystein (C) zu Tyrosin (Y). Hingegen wird bei der H63D-Variante Cytosin durch Guanin am Nukleotid 187 und dadurch Histidin (H) durch Asparaginsäure (D) im HFE-Protein ersetzt (Feder *et al.*, 1996).

1999 wurde von Mura *et al.* eine dritte Substitution im *HFE-Gen* (S65C, OMIM #235200.0003) am Nukleotid 193 mit einem Austausch von Adenin zu Tyrosin, der in einen Aminosäureaustausch von Serin (S) zu Cystein (C) resultiert, beschrieben (Mura *et al.*, 1999). Seitdem wurden einige weitere Variationen im *HFE-Gen* gefunden, deren Datenlage jedoch lässt keine Schlüsse auf eine funktionelle Bedeutung zu.

Die Allelfrequenz der C282Y-Variante zeigt eine starke geographische Variation. In Europa ist ein starkes Nord/West-Süd/Ost-Gefälle zu beobachten mit einer Allelfrequenz von 5,1 – 9,7% in Nordeuropa, 3,1 – 4,8% in Mitteleuropa und 0 – 3,1% in Südeuropa (Lucotte und Dieterlen, 2003). In Irland beträgt die Frequenz bis zu 14%. Dies wird als Hinweis auf einen keltischen Ursprung der C282Y-Variante interpretiert (Lucotte und Dieterlen, 2003). Wahrscheinlich ist die C282Y-Variante auf einem einzigen Chromosom (Haplotyp) entstanden und hat sich durch einen Gründer-Effekt und durch Migration in Europa ausgebreitet. Milman *et al.* hingegen stellten die Hypothese auf, dass die C282Y-Variante vor 60 bis 70 Generationen in Südsandinavien aufgetreten ist und sich durch die Migrationsbewegungen der Wikinger verbreitet hat (Milman und Pedersen, 2003). Möglicherweise ist die hohe Prävalenz der C282Y-Variante ein Hinweis darauf, dass der Phänotyp in der Evolution eine Überlebensvorteil bei Nahrungsmangel, Infektionen und rezidivierendem Blutverlust (z.B. bei Geburten, kriegerischen Auseinandersetzungen) darstellte und die

Genvariante somit einer positiven Selektion unterworfen war (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

Die H63D-Variante zeigt eine Allelfrequenz von 16-25% (Bacon *et al.*, 1999). Die Verteilung variiert zwar innerhalb von Europa, jedoch zeigt sie kein Nord-Süd-Gefälle wie die C282Y-Variante. Anders als diese, ist die H63D-Variante in der ganzen Welt zu finden, während die C282Y-Variante in Populationen nicht-europäischer Herkunft kaum zu finden ist (Worwood, 2005).

1.3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Angaben über den Phänotyp der *HFE*-Gen-Varianten variieren stark. Erhöhte Eisenwerte der Leber werden in nahezu allen Patienten gefunden, die homozygot sind für die C282Y-Variante (Lyon und Frank, 2001). Laut Beutler *et al.* erkranken jedoch weniger als 1% der Patienten mit einer homozygoten C282Y-Variante an einer klinisch manifesten Eisenspeichererkrankung (Beutler *et al.*, 2002).

Auf die *HFE*-Gen-Varianten geht die klassische hereditäre Hämochromatose zurück. Durchschnittlich 85 – 90% der Patienten mit manifester Hämochromatose sind Träger der homozygoten C282Y-Variante (Feder *et al.*, 1996). Wesentlich seltener (3-5%) kann eine so genannte Gemischte-Heterozygotie C282Y/H63D im *HFE*-Gen nachgewiesen werden (Bacon *et al.*, 1999). In 10 bis 15% der Fälle ist der Hämochromatose-Phänotyp bei Alterationen in anderen Genen mit Bedeutung für den Eisenmetabolismus (Ferroportin, Transferrinrezeptor 2, Hepcidin) zu finden (Pietrangelo, 2004). Die hereditäre Hämochromatose gehört zu den häufigsten vererbten Stoffwechselerkrankungen. Es kommt auf Grund der erhöhten intestinalen Eisenresorption zu einem Anstieg des Gesamtkörper Eisens und zu einer vermehrten Einlagerung von Eisen in parenchymatösen Organen, wie z.B. Leber, Pankreas und Herz. Die Organe werden dadurch anfangs reversibel, im späteren Verlauf irreversibel geschädigt.

Heterozygote Anlageträger für die C282Y-Variante erkranken nicht häufiger an Hämochromatose als die Normalbevölkerung. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Transferrinsättigung, das Serum-Ferritin sowie die hepatische Eisenkonzentration

bei heterozygoten Anlageträgern erhöht sind (Beutler *et al.*, 2003; Bulaj *et al.*, 1996). Besonders bedeutsam ist auch der Nachweis einer Eisenakkumulation in der Leber. Allerdings entwickeln diese Individuen keine progressive Lebererkrankung, wenn andere Komorbiditätsfaktoren fehlen (Wallace *et al.*, 1999).

Auch die H63D-Variante führt zu einer milden, aber nachweisbaren Eisenakkumulation (Beutler *et al.*, 2000). Patienten mit einem gemischt-heterozygoten C282Y/H63Y-Genotyp weisen erhöhte Eisen-Parameter im Serum bei nur geringer Eisenakkumulation in der Leber auf (Lim *et al.*, 2004).

Insgesamt unterliegt die Genotyp-Phänotyp-Assoziation bzw. der klinische Verlauf einer breiten Variation auf Grund anderer Komorbiditätsfaktoren wie Geschlecht, Alter, Ernährung und Umweltfaktoren. Dies erschwert das Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zusätzlich. Bei prämenopausalen Frauen fällt z.B. auf Grund des physiologischen Eisenverlustes die Eisenakkumulation insgesamt geringer aus als bei Männern (Barton *et al.*, 1996).

1.3.3 Pathophysiologie der Eisenakkumulation

Das *HFE*-Gen-Produkt weist Strukturähnlichkeit mit dem klassischen MHC-Molekül der Klasse I auf, jedoch bindet und präsentiert es keine endogenen Peptide (Bacon *et al.*, 1999). Es ist hauptsächlich an der basolateralen Membran der Enterozyten in den Dünndarmkrypten lokalisiert und besitzt neben drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) eine Transmembrandomäne und einen kleinen zytoplasmatischen Teil. Das HFE-Protein geht über die $\alpha 3$ -Region eine nicht kovalente Bindung mit β_2 -Mikroglobulin ein (Enns, 2001). Der HFE- β_2 -Mikroglobulin-Komplex erhöht die Affinität des Transferrinrezeptors zu Transferrin. Die Aufnahme des an Transferrin gebundenen Eisens über den Transferrinrezeptor geschieht via Endozytose. Die Eisenmoleküle werden intrazellulär aus dem Endosom freigesetzt. Eine erhöhte Konzentration intrazellulären Eisens reprimiert die Expression des DMT1-Transporters (divalenter Metallionen-Transporter 1), der an der apikalen Seite der Enterozyten an der Dünndarmzottenspitze für die intestinale Eisenresorption zuständig ist.

Biochemische und strukturelle Analysen des HFE-Proteins ergaben, dass die C282Y-

Gen-Variante auf Grund des Ausbleibens einer intramolekularen Disulfidbrücke zu einer inkorrekten Faltung des Proteins führt. Daraus resultiert eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum und die Präsentation an der Zelloberfläche wird verhindert (Feder *et al.*, 1997). Da der positiv modulierende Effekt des HFE-Protein- β_2 -Mikroglobulin-Komplexes am Transferrinrezeptors ausbleibt, wird weniger Transferrin gebunden und in der Folge weniger Eisen in die Kryptenzellen aufgenommen. Durch die Abnahme der intrazellulären Eisenkonzentration in den Enterozyten wird die Expression von DTM1-Rezeptoren enthemmt und daher auch die Eisenresorption der später aus den Krypten in die Villi gewanderten Enterozyten aus dem Darmlumen verstärkt. Dieses pathogenetische Modell der ungebremsten Eisenaufnahme wird auch als „crypt-programming-model“ bezeichnet.

Die H63D-Variante hat keine Auswirkung auf die Bindung von β_2 -Mikroglobulin bzw. die Formation des HFE- β_2 -Mikroglobulin-Komplexes, reduziert jedoch die Affinität des Transferrinrezeptors zu Transferrin (Bacon *et al.*, 1999).

Die Effekte der C282Y- und H63D-Variante sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

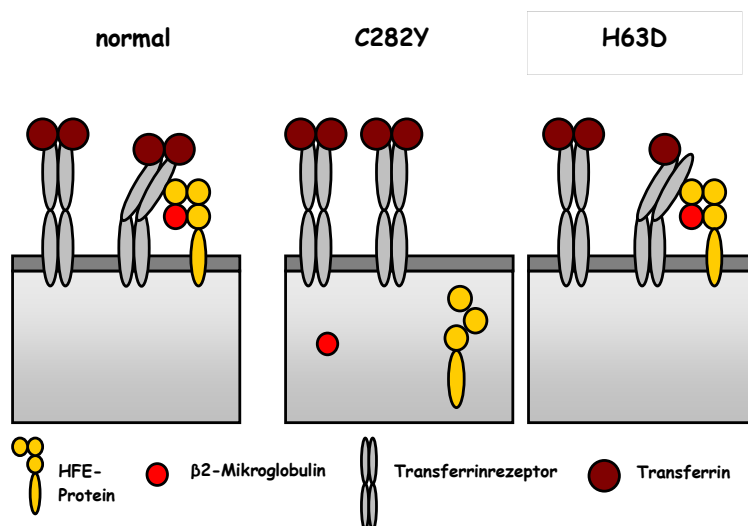


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Effekte der C282Y- und H63D-Variante

Um die bei mutiertem HFE-Protein erhöhte duodenale Eisenaufnahme zu erklären wird auch ein zweites pathogenetisches Modell diskutiert (Németh *et al.*, 2004). Dieses Modell postuliert eine zentrale Rolle des „Eisenhormons“ Hepcidin, welches von den

Hepatozyten synthetisiert wird und die Eisenaufnahme im Duodenum sowie die Eisenfreisetzung durch Makrophagen und Hepatozyten hemmt. Die Hemmung erfolgt durch eine direkte Bindung des Hepsidins an Ferroportin mit anschließender Internalisierung und Degradation. Bei hoher Eisenkonzentration im Plasma wird viel Hepsidin freigesetzt, was zur Eisenfreisetzung führt. Bei niedriger Eisenkonzentration wird die Hepsidin-Synthese gedrosselt und die Eisenaufnahme im Duodenum bzw. die Freisetzung durch Makrophagen erhöht. So besteht eine inverse Korrelation zwischen Hepsidin-Spiegel und Eisenaufnahme bzw. Freisetzung. Bei der *HFE*-Gen-assoziierten Hämochromatose ist diese physiologische Regulation gestört. Hier finden sich zu niedrige Hepsidin-Spiegel, weshalb die Eisenaufnahme trotz Eisenüberladung ungebremst fortgesetzt wird.

1.4 Chronische Lebererkrankungen

1.4.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Europa und Nordamerika werden etwa 30 bis 50% aller chronischen Lebererkrankungen und bis zu 80% aller Leberzirrhosen durch erhöhten Alkoholkonsum verursacht. Das Institut für Therapieforschung errechnete für das Jahr 2006, dass über 8 Millionen Deutsche im Alter von 18 bis 69 Jahren einen riskanten Alkoholkonsum (tägliche Aufnahme von mehr als 40g Reinalkohol bei Männern bzw. 20g Reinalkohol bei Frauen) aufweisen (Institut für Therapieforschung, 2006). Bei chronischem Alkoholkonsum über diesen Grenzwert entwickeln 30% der Betroffenen eine Fettleberhepatitis und das Risiko für Leberzirrhose ist 6fach erhöht.

Eine ebenfalls sehr bedeutsame Ursache chronischer Lebererkrankungen ist die Infektion mit Hepatitis B- und C-Viren. Die chronische Hepatitis B-Virusinfektion ist eine Infektionskrankheit mit weltweit etwa 300 bis 420 Millionen HBV-Trägern (ca. 5 bis 7% der Weltbevölkerung) und verursacht ca. 1 Millionen Todesfälle im Jahr. Es ist davon auszugehen, dass 0,4 bis 0,8% der bundesdeutschen Bevölkerung Virusträger sind (Robert Koch Institut, 2006). Risikogruppen sind i.v.-Drogenabhängige, promiskuitive Hetero- und Homosexuelle, Empfänger von Blutprodukten, Dialysepatienten und

Beschäftigte im medizinischen Bereich. Der natürliche Verlauf der Hepatitis B-Virusinfektion ist variabel. Das Spektrum der Symptome reicht von einer unbemerkten oder symptomarmen bis hin zu einer fulminanten Hepatitis. Etwa 10 bis 30% der Patienten entwickeln eine chronische Hepatitis B-Virusinfektion. Von diesen Patienten erreichen wiederum ca. 15% das Stadium einer Leberzirrhose und 0,5% entwickeln ein HCC.

Etwa 100 bis 139 Millionen Menschen weltweit sind laut den Angaben des Robert-Koch-Instituts chronisch mit dem Hepatitis C-Virus infiziert. Entsprechend der Inzidenzrate der Hepatitis C-Virusinfektion sind vor allem Länder im asiatischen und afrikanischen Raum sowie Länder in Südeuropa betroffen. In Deutschland beträgt die Prävalenz von HCV-Antikörpern etwa 0,4 bis 0,7%. Da 60 bis 80% der Infektionen chronisch verlaufen, leben in Deutschland schätzungsweise 400 000 bis 500 000 Virusträger (Robert Koch Institut, 2006). Risikogruppen sind unter anderem i.v.-Drogenabhängige, Empfänger von Blutprodukten oder Organtransplantaten, medizinisches Personal und Sexualpartner von HCV-Trägern. In Europa und Nordamerika verursacht die Hepatitis C-Virusinfektion ca. 40% der Zirrhoseerkrankungen und etwa 60% der HCC. Da ein Anstieg der HCV-Prävalenz zu verzeichnen ist, wird erwartet, dass die HCV-assoziierte Morbidität und Mortalität in den kommenden Jahren noch steigen wird (Robert Koch Institut, 2006).

Die Autoimmunhepatitis ist eine chronische, entzündliche Lebererkrankung, von der in 70 bis 90% der Fälle Frauen betroffen sind, und die mit zwei Altersgipfeln zwischen dem 10. und 30. sowie dem 50. und 70. Lebensjahr auftritt. Als Auslöser werden Umwelttoxine, bakterielle Antigene (z.B. Salmonellen-Antigene) und Viren diskutiert. Charakteristisch ist das Auftreten von Autoantikörpern (ANA, SMA, LKM-1, SLA/LP). Sie sind nicht für die Pathogenese der Autoimmunhepatitis verantwortlich, stellen aber für die Diagnose führende serologische Marker dar. Unbehandelt kann die Autoimmunhepatitis in eine Leberzirrhose übergehen.

Ätiologisch weiterhin bedeutsam ist die primär biliäre Zirrhose, eine chronische, nichteitrig und destruierende Cholangitis unbekannter Ursache. Sie betrifft in 90% der Fälle Frauen. Charakteristisch für die primär biliäre Zirrhose ist der Nachweis

antimitochondrialer Antikörper (AMA) und Antikörper gegen Gallengänge. Histologisch finden sich Gallengangsdestruktionen, Gallengansproliferation und entzündliche Infiltrate in den Portalfeldern. Innerhalb von 10 bis 20 Jahren kann sie unbehandelt zur Leberzirrhose führen. In bis zu 10% können auch Mischformen z.B. von primär biliärer Zirrhose und Autoimmunhepatitis auftreten (Overlap-Syndrom).

Unter der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) versteht man eine progredient fibrosierende Krankheit der Leber, die zu einer bindegewebigen Ummauerung der extra- und intrahepatischen Gallenwege führt. Die Inzidenz beträgt ca. 1 – 5/100 000 Einwohnern. Die PSC ist in 80 bis 90% mit einer chronisch entzündlichen Darmkrankheit (Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn) vergesellschaftet. Unbehandelt kann sie in 10 bis 20 Jahren zur Zirrhose führen.

Bei der nichtalkoholischen Leberverfettung („nonalcoholic fatty liver disease“, NAFLD) und, im Fall von hinzutretender Entzündung, bei der nichtalkoholischen Fettleberhepatitis („nonalcoholic steatohepatitis“, NASH) werden histologisch ähnliche Veränderungen wie bei der alkoholischen Leberverfettung beobachtet. NAFLD und NASH kommen gehäuft bei Patienten mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und metabolischem Syndrom vor.

1.4.2 Leberzirrhose

Im Rahmen einer hepatozellulären Schädigung transdifferenzieren Sternzellen (Ito-Zellen), durch Entzündungsmediatoren aktiviert, zu Myofibroblasten und proliferieren. Der myofibroblastische Phänotyp der Sternzellen synthetisiert vermehrt Extrazellulärmatrix, was letztendlich zu einer Fibrosierung der Leber führen kann (Wasmuth *et al.*, 2003). Die Leberzirrhose ist Folge dieses diffusen Vernarbungsprozesses, der durch kontinuierlichen Zelluntergang unterhalten wird. Durch fibrotische Brückenbildung zwischen benachbarten Portalfeldern und zwischen Portalfeldern und Zentralvenen kommt es zu einer Zerstörung der Gefäß- und Läppchenarchitektur der Leber. Daraus resultiert eine strukturelle und funktionelle Veränderung des Leberparenchyms. Des Weiteren kommt es zur Bildung von so genannten Regeneratknoten. Solange keine klinischen Folgen wie Aszites, Ikterus oder hepatische Enzephalopathie vorgefunden werden, wird die Leberzirrhose als

kompensiert bezeichnet.

Da ein großer Teil der Leberzirrhosen symptomlos und daher unerkannt bleibt, kann ihre Inzidenz und Prävalenz nicht präzise bestimmt werden. Für die USA und Nordeuropa wird die Inzidenz auf 250 Fälle pro 100 000 Einwohner im Jahr geschätzt (Caselmann *et al.*, 1997). Männer sind weitaus häufiger betroffen als Frauen.

1.4.3 Leberzellschäden durch Eisen

Ionisiertes Eisen induziert in der Zelle Oxidationsprozesse, welche zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale führen. Diese verursachen Lipidperoxidation an Phospholipiden, was wiederum zu Schädigung von Zellkompartimenten führen kann und damit zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme ins Zytosol. Die Folgen sind DNA-Schädigung und letztendlich Zelltod (Britton und Bacon, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Eisen auch auf direktem Wege die Kollagenbiosynthese stimulieren kann (Ramm *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass diese Prozesse ab einer Eisenkonzentration von 400 µM/g Lebertrockengewicht in Gang gesetzt werden (Bassett *et al.*, 1986). Allerdings kann diese Schwelle durch erhöhten Alkoholkonsum, virale Infektionen und andere begleitende Lebererkrankungen herabgesetzt werden.

1.5 Hepatozelluläres Karzinom

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Das Hepatozelluläre Karzinom ist ein maligner Tumor, der primär von Hepatozyten ausgeht. Es verursacht über 90% aller bösartigen primären Lebertumoren im Erwachsenenalter. Weltweit ist das HCC mit einer jährlichen Rate von einer Million Neuerkrankungen das fünfthäufigste Malignom, wobei die Inzidenz weiter steigend ist (Dominguez-Malagon und Gaytan-Graham, 2001). Es verursacht weltweit schätzungsweise 250 000 Todesfälle jährlich (Ameis, 2000). Bezüglich der Prävalenz des HCC ist eine breitgefächerte geographische Variation zu beobachten. Die Hochrisikopopulationen sind in China, Süd-Ost-Asien und in Afrika südlich der Sahara zu finden (Chen *et al.*, 1997; Dominguez-Malagon und Gaytan-Graham, 2001). In

Deutschland und Mitteleuropa ist das Risiko für die Entwicklung eines HCC zwar vergleichsweise gering, jedoch ist auch hier in den letzten Jahren eine steigende Inzidenzrate zu beobachten (Erhardt *et al.*, 2002). In Deutschland treten jährlich vier- bis achttausend Neuerkrankungen auf. Bereits im Jahr 2000 rangierte das HCC an siebter Stelle bezüglich der Häufigkeit von Tumorerkrankungen in der Bevölkerung (Ameis, 2000). Die HCC-Prävalenz ist bei Männern generell 4- bis 10fach höher als bei Frauen.

1.5.2 Ätiologie

In den westlichen Ländern ist die Leberzirrhose in Folge chronischer Lebererkrankung die wichtigste Ursache für die Entwicklung eines HCC; es tritt in weit über 80% der Fälle in einer zirrhotisch vorgeschädigten Leber auf (Montalto *et al.*, 2002). In Deutschland entwickeln 5% aller Patienten mit Leberzirrhose im Laufe ihrer Erkrankung ein HCC.

Patienten mit einer HBV-assoziierten Leberzirrhose haben in Europa ein jährliches Risiko von bis zu 2,2% ein HCC zu entwickeln (Fattovich *et al.*, 2004). Die Bedeutung des Hepatitis B-Virus für die Karzinogenese des HCC wird auch durch den Umstand deutlich, dass 40% aller HCC-Patienten an einer chronischen Hepatitis B-Virusinfektion leiden (Donato *et al.*, 1998; Fattovich *et al.*, 2004). Auch der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion wird bezüglich der Entwicklung eines HCC eine tragende Rolle zugeschrieben (Donato *et al.*, 1998; Fattovich *et al.*, 2004). Patienten mit einer HCV-assoziierten Leberzirrhose haben in Europa und den USA ein jährliches Risiko von bis zu 3,7% ein HCC zu entwickeln (Fattovich *et al.*, 2004). Vor allem in Deutschland und den USA stellt die alkoholtoxisch induzierte Leberzirrhose eine häufige Grunderkrankung für das HCC dar (Sterneck, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko ein HCC zu entwickeln bei erhöhtem Alkoholkonsum nicht nur um das vierfache gesteigert wird, sondern auch das Auftreten des Karzinoms um etwa fünf Jahre beschleunigt wird (Yamauchi *et al.*, 1993).

Weitere Risikofaktoren sind genetische Erkrankungen wie Hämochromatose, α_1 -Antitrypsin-Defizienz, Morbus Wilson und die Exposition gegenüber Arbeits- und Umwelttoxinen wie z.B. Aflatoxin B1 des Pilzes *Aspergillus flavus* oder aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen, die beispielsweise in Lösungsmitteln

vorhanden sind (Suriawinata und Xu, 2004).

1.5.3 Molekulare Pathogenese

Im Allgemeinen ist für die Entwicklung eines HCC meist ein chronischer Entzündungsreiz und die daraus bedingte Steigerung des Zellumsatzes pathogenetisch. Leberparenchym, das im Laufe von Entzündungsprozessen von Gewebsuntergang betroffen ist, reagiert auf den Schaden mit Gewebsregeneration und intensiver Zellproliferation. Darüber hinaus sind Entzündungsprozesse auch immer mit einer durch Immunzellen vermittelten Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus, der Synthese reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies und in der Folge mit Lipidperoxidation verbunden (Maeda und Akaike, 1998). Die bei diesen Prozessen entstehenden bioreaktiven Stoffwechselprodukte sind auch in der Lage genomische DNA und Proteine zu schädigen. Die Akkumulation daraus resultierender genetischer Veränderungen ist durch den Regenerationsdruck der Leberzellen in besonderem Maße verstärkt. Als Konsequenz kann es schließlich zur Expansion einer Zellpopulation kommen, die gegenüber ihren Nachbarzellen im Gewebeverband mit entscheidenden Wachstumsvorteilen ausgestattet ist. Parallel zur Tumorprogression wächst die Zahl inaktiver Tumorsuppressorgene und aktivierter Proto-Onkogene (Ballhausen, 2003).

Eine Besonderheit stellt das Hepatitis B-Virus dar, welches auch auf direktem Wege als Karzinogen wirken kann. Werden Fragmente der viralen DNA in das menschliche Genom integriert, können genomische Veränderungen wie Deletionen, Duplikationen und Rekombinationen resultieren. Durch solche Neuarrangements können auch Gene in Mitleidenschaft gezogen werden, die Kontrollfunktionen über zelluläre Differenzierung, Proliferation und den programmierten Zelltod wahrnehmen (Robinson, 1994). Auch das X-Protein des Virus kann durch eine transaktivierende bzw. immunmodulierende Wirkung die Entstehung eines HCC begünstigen.

Im Gegensatz zum Hepatitis B-Virus kann das Hepatitis C-Virus nicht in das humane Wirtsgenom integrieren, da es sich um ein RNA-Virus handelt. Es wird jedoch angenommen, dass das Virus Onkogene aktivieren bzw. Tumorsuppressorgene inaktivieren kann (Kasai *et al.*, 1996). Eine zentrale Funktion hat dabei das virale Protein NS3. Über Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NS3 und p53 kann eine

Inaktivierung der Tumorsupressorfunktion von p53 erfolgen (Ray *et al.*, 1997).

Alkohol induziert durch das Abbauprodukt Acetaldehyd Autoantigene, welche Ziele für zytotoxische T-Lymphozyten darstellen (Durr und Caselmann, 2000). Dadurch werden eine chronische Leberzelldestruktion und die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen begünstigt. Außerdem erfolgt eine alkoholabhängige Induktion mutagenaktivierender Enzyme des Cytochrom-P450-Systems.

1.6 Fragestellung

Immer wieder wird beobachtet, dass in einer Gruppe von Menschen, die unter vergleichbaren Bedingungen leben und gemeinsam bestimmten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, nur einige Individuen als Folge dieser Umwelteinflüsse erkranken. Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, warum beispielsweise bestimmte Patienten mit übermäßigem Alkoholkonsum nach einigen Jahren eine Leberzirrhose entwickeln, während andere, trotz vergleichbarer Exposition, davon verschont bleiben.

Die Leberzirrhose als Endstadium verschiedener chronischer Lebererkrankungen und das HCC sind epidemiologisch bedeutsame Erkrankungen, die die Lebensqualität und die Lebenserwartung des betroffenen Patienten deutlich einschränken. Sie können als multifaktorielle Erkrankungen betrachtet werden, deren natürlicher Verlauf von exogenen Faktoren (z.B. Virusinfektion, Alkoholkonsum), aber auch vom Vorliegen verschiedener veränderter Gene abhängig ist. Diese komplexen genetischen Merkmale können dabei für erhebliche Unterschiede bezüglich der Suszeptibilität und damit für das Auftreten einer Leberzirrhose bzw. eines HCC verantwortlich sein.

Die *HFE*-Gen-Varianten C282Y und die H63D sind häufig in der nordeuropäischen Bevölkerung zu finden. Träger einer homozygoten C282Y-Variante weisen eine abnorm gesteigerte intestinale Eisenresorption auf, was unter Umständen zur klassischen hereditären Hämochromatose führen kann. Individuen mit einer heterozygoten C282Y- oder homozygoten H63D-Variante erkranken trotz gering gesteigerter intestinaler Aufnahme und hepatischer Einlagerung von Eisen normalerweise nicht manifest an den Folgen der Eisenakkumulation. Möglicherweise moduliert jedoch die hepatische

Eiseneinlagerung die Entzündungsaktivität und den Fibrosegrad der Leber bei gleichzeitigem Vorliegen einer chronischen Lebererkrankung. Darüber hinaus kann ein karzinogener Effekt durch Eisenakkumulation auch für die Entwicklung des HCC eine Rolle spielen. Möglicherweise stellen die *HFE*-Gen-Varianten wichtige Kofaktoren für die Progression von Lebererkrankungen oder die Entstehung Leberzirrhose oder eines HCC dar.

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, ob die *HFE*-Gen-Variationen C282Y und H63D die Entwicklung und Progression chronischer Lebererkrankungen und die Entwicklung eines HCC negativ beeinflussen. Zu diesem Zweck soll geprüft werden, ob eine Assoziation besteht zwischen dem *HFE*-Genotyp und dem Fibrosegrad, dem Vorliegen einer kompensierten bzw. dekompenzierten Leberzirrhose, sowie dem Vorliegen eines HCC. Auch soll der *HFE*-Genotyp von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und Kontrollpersonen verglichen werden.

Im Rahmen von Subgruppenanalysen sollen Grunderkrankungen benannt werden, die, die bei Vorliegen einer *HFE*-Gen-Variante ein besonders hohes Risiko für Erkrankungsprogression oder HCC haben und von einer veränderten Therapie profitieren könnten.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenerhebung

Aus dem Patientengut der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Campus Virchow-Klinikum – Universitätsmedizin Berlin wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die auf Grund chronischer Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese behandelt wurden und unten genannte Diagnosekriterien erfüllten. Die Auswahl der Studienpatienten erfolgte in der Transplantationsambulanz der chirurgischen Klinik bzw. in der Lebersprechstunde der Medizinischen Klinik.

Für die Durchführung der Studie lag eine Zustimmung der Ethikkommission der Charité vor. Von allen Studienteilnehmern wurde eine schriftliche Einwilligungserklärung eingeholt.

2.1.2 Klinische und demographische Patientendaten

Anhand der Krankenakten der Studienpatienten wurden folgende Angaben erhoben:

- Personendaten (Geburtsdatum, Geschlecht, Ethnizität)
- Alter (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. histologischen Untersuchung)
- Größe und Gewicht
- Hauptdiagnosen (Grunderkrankung, Leberzirrhose, HCC)
- Nebendiagnosen
- Medikamentenanamnese
- vorausgegangene Therapeutische Interventionen (Operationen, Medikamente)
- gesundheitsschädigende Lebensgewohnheiten (Alkoholkonsum, Nikotinabusus)

2.1.3 Klinisch-chemische Parameter

Die laborchemischen Untersuchungen wurden am Institut für Laboratoriumsmedizin und

Pathobiochemie der Charité durchgeführt. Erfasst wurden klinisch-chemische Parameter für den Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. bei Kontrolluntersuchungen sowie zum Zeitpunkt der Evaluation zur Lebertransplantation (LTX).

Es wurden insbesondere Angaben zur Hepatitis B- und C-Virusserologie den Patientenakten entnommen (HBsAg, anti-HBc bzw. anti-HCV, HCV-RNA (PCR), HCV-RNA (quan.)).

Tabelle 3: Klinisch-chemische Parameter

Blutzellstatus	Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, MCV, MHC, MCHC Leukozyten, Thrombozyten
Leberenzyme/-funktionsparameter	AST (GOT), ALT (GPT), γ -GT, AP, PCHE, Bilirubin, Protein, Albumin
Blutfette	Triglyceride, Cholesterin
Immunglobuline	IgG, IgA, IgM
Eisenstatus	Eisen, Ferritin, Transferrin, Transferrin-Sättigung
Auto-Antikörper	Antinukleäre Antikörper (ANA) Antineutrophile-cytoplasmatische Antikörper (ANCA) Antimitochondriale Antikörper (AMA) Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosomen (LKM) Antikörper gegen „soluble liver antigen“ (SLA) Antikörper gegen Leber-Pankreas-Antigen (LP) Antikörper gegen Actin (actin) Antikörper gegen „smooth muscle antigen“ (SMA)

2.1.4 Histologische Untersuchung/Fibrosegrad-Bestimmung

Bei Leberpunktion, Laparoskopie oder Lebertransplantation gewonnenes Gewebematerial wurde einer histologischen Untersuchung am Institut für Pathologie der Charité zugeführt. Die standardmäßig gefärbten Leberpräparate wurden hinsichtlich des Fibrosegrades nach dem semiquantitativen Bewertungssystem nach Scheuer klassifiziert (Scheuer, 1991), das in Tabelle 4 dargestellt ist.

Tabelle 4: Fibrosegradeinteilung bei chronischer Hepatitis nach Scheuer (Scheuer, 1991)

<i>Grad</i>	<i>Deskriptiv</i>	<i>histologische Kriterien</i>
0	keine Fibrose	normales Leberparenchym
1	portale Fibrose	fibröse portale Ausweitung
2	periportale Fibrose	periportal oder porto-portale Septen, Gewebearchitektur intakt
3	septale Fibrose	fibröse Septen mit Zerstörung der Gewebearchitektur
4	Zirrhose	Zirrhose

2.1.5 Diagnosekriterien

Die jeweilige Diagnose wurde in der Zusammenschau klinischer und laborchemischer Parameter und insbesondere mit den für die jeweilige Erkrankung charakteristischen bildmorphologischen und histologischen Befunden gestellt.

2.1.5.1 Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom

Als Patienten mit Leberzirrhose bzw. mit HCC wurden in dieser Studie Patienten bezeichnet, für welche gemäß der Krankenakte diese Diagnose an Hand eines histologischen Ergebnisses nach sonographisch gesteuerter Leber- bzw. Tumorpunktion, Laparoskopie mit Leber- bzw. Tumorbiopsie, Tumorexzision oder orthotoper Lebertransplantation gestellt wurde, oder wenn in Zusammenschau von bildmorphologischen Befunden und klinischen und klinisch-chemischen Verlaufskontrollen eine Leberzirrhose bzw. ein HCC bestätigt werden konnten. Von der Diagnose ausgeschlossen wurden Patienten, für welche keine oder keine eindeutigen histologischen, bildmorphologischen, klinischen oder klinisch-chemischen Befunde in der Krankenakte vorlagen.

2.1.5.2 Autoimmunhepatitis

Die Autoimmunhepatitis (AIH) wurde insbesondere an Hand des Nachweises von

Autoantikörpern (ANA, SMA, LKM-1, SLA/LP, ANCA) oder an Hand einer für die Autoimmunhepatitis charakteristischen Histologie diagnostiziert.

2.1.5.3 Alkoholtoxische Lebererkrankung

Die Diagnose der alkoholtoxischen Lebererkrankung („alcoholic liver disease“, ALD) wurde bei Patienten gestellt, bei denen ein stark erhöhter Alkoholkonsum in der Anamnese bekannt war. Als stark erhöhter Alkoholkonsum wurde eine tägliche Aufnahme von mindestens 20 g Reinalkohol für Frauen bzw. 40 g Reinalkohol für Männer über einen Zeitraum von mehreren Jahren angenommen.

2.1.5.4 Chronische Hepatitis B- und C-Virusinfektion

Die Diagnose der chronischen Hepatitis B- bzw. C-Virusinfektion (HBV, HCV) an Hand von Verlaufskontrollen gestellt, welche die serologische Persistenz von HBsAg bzw. anti-HCV und HCV-RNA (PCR und/oder quan.) über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten in der Krankenakte belegen. Patienten, für welche nach den oben beschriebenen Definitionskriterien sowohl eine chronische Hepatitis B- als auch C-Virusinfektion erfasst werden konnte, wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.1.5.5 Kryptogene Lebererkrankung

Bei der kryptogenen Lebererkrankung („cryptogenic liver disease“, CLD) wurde die Diagnose in der Zusammenschau klinischer, laborchemischer und histologischer Parameter gestellt wenn keine andere positiv identifizierbare Ursache der Leberzirrhose evaluiert werden konnte. Ein Hinweis auf erhöhten Alkoholkonsum in der Anamnese wurde ausgeschlossen, positive Virusmarker fehlten. In Hinblick auf die vorbeschriebene Heterogenität der Erkrankung (Berg *et al.*, 2002) wurde insbesondere der Abgrenzung der kryptogenen Lebererkrankung von einer Autoimmunhepatitis Rechnung getragen.

2.1.5.6 Nichtalkoholische Fettleberhepatitis

Die Diagnose der nichtalkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) wurde gestellt, wenn gemäß der Krankenakte klinisch, laborchemisch und bildmorphologisch die Zeichen

einer Fettleberhepatitis belegt werden konnten, ohne dass anamnestisch ein relevanter Alkoholkonsum oder andere positiv identifizierbare Ursachen evaluiert werden konnten.

2.1.5.7 Cholestatische Lebererkrankungen

Eine primär biliäre Zirrhose (PBC) wurde an Hand von klinischen und klinisch-chemischen Befunden (Erhöhung der Cholestaseparameter und IgM-Werte, antimitochondrialen Antikörper (AMA)) oder an Hand einer Leberhistologie diagnostiziert.

Als Patienten mit primär sklerosierende Cholangitis (PSC) wurden Patienten bezeichnet, für welche an Hand einer endoskopisch-retrograden Cholangiographie die typischen Veränderungen der intra- und extrahepatischen Gallengänge nachgewiesen werden konnten.

2.2 Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden 355 gesunde Personen (Klinikmitarbeiter, Studenten, Teilnehmer der Berlin Aging Study) eingeschlossen. Bei diesen Personen erfolgte eine venöse Blutentnahme mit EDTA-Blut-Röhrchen.

2.3 Materialien

2.3.1 Geräte

LightCycler	LightCycler II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Software	Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Maschine	T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
Zentrifugen	Varifuge RF, Heraeus Sepatech
	Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg

Pipetten	Eppendorf Multipipette plus, Eppendorf AG, Hamburg
	Research-Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Multichannel Finnpipette 5-50µl, 40-200 µl, Thermolabsystems, Egelsbach

2.3.2 Reagenzien, Enzyme, Puffer, Primer und Sonden

Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt
Steriles Wasser	Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen
PCR-Öl	Bayol F, Serva, Heidelberg
Taq-Polymerase	AmpliTaq Gold, PerkinElmer, Massachusetts, USA
PCR-Puffer	10x PCR buffer, PerkinElmer, Massachusetts, USA
dNTPs	PerkinElmer, Massachusetts, USA
MgCl ₂	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Primer und Sonden	TIBMOLBIOL, Berlin

2.3.3 Verbrauchsmaterialien

DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg
	8-Tube-Strip, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
LightCycler Kapillaren	Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.4 Methoden

2.4.1 Extraktion der genomischen DNA

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus durch Venenpunktion gewonnenen Blutproben mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 200 µl EDTA-Blut mit 20 µl Qiagen Proteaselösung und 200 µl Puffer AL versetzt und gründlich vermischt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei

56 °C in einem Wasserbad. Dann wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt und die Proben erneut gemischt. Die Probenmischung wurde über eine QIAamp Säule für 3 Minuten bei 3000 rpm in zwei Arbeitsschritten zentrifugiert, um die Patienten-DNA in Spezialfilter der Filtersäule zu binden und Zellreste davon zu trennen. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Puffer AW1 beladen und für eine Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Entsprechend wurde die Säule mit Puffer AW2 beladen und für 15 Minuten zentrifugiert. Um Patienten-DNA aus dem Filter zu eluieren, wurde der Filter mit 200 µl Puffer AE benetzt und nach Inkubation von einer Minute für 5 Minuten mit 5000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden folgende Primer benutzt:

Tabelle 5: Primersequenzen C282Y (Position nach GenBank accession #Z92910)

<i>Primer</i>	<i>Position</i>	<i>Länge (bp)</i>
Forward: 5'-Tgg-CAA-ggg-TAA-ACA-gAT-CC-3'	6443 - 6462	20
Reverse: 5'-CTC-Agg-CAC-TCC-TCT-CAA-CC-3'	6832 - 6813	20
Produkt	6443-6832	390

Tabelle 6: Primersequenzen H63D und S65C (Position nach GenBank accession #Z92910)

<i>Primer</i>	<i>Position</i>	<i>Länge (bp)</i>
Forward: 5'-gCC-TCA-gAg-CAg-gAC-CTT-gg-3'	4684 - 2703	20
5'-CAg-CTg-TTT-CCT-TCA-AgA-TgC-3'	4993 - 4973	21
Produkt	4684-4993	400

Für den Duplex-PCR-Reaktionsmix wurden jeweils 0,25 µl 282-Forward Primer (10 µM) und 282-Reverse Primer (10 µM), jeweils 0,2 µl 63/65-Forward Primer (10 µM), 63/65-Reverse Primer (10 µM) und Taq-Polymerase (5 U/µl), jeweils 1,5 µl MgCl₂ (15 mM) und dNTP's (je 10 mM), 3,0 µl DNA und 2,5 µl 10xPuffer miteinander vermischt und mit

H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Die PCR lief unter folgenden Konditionen ab:

Tabelle 7: Temperaturprofil der LightCycler-PCR

<i>Prozess</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initiale Denaturierung	95 °C	12 min
Amplifikation		
Denaturierung	95 °C	20 s
Annealing	56 °C	40 s
Elongation	72 °C	90 s
→ 48 Zyklen		
Terminale Extension*	72 °C	2 min

*Es wurde nach der terminalen Extension auf 5 °C abgekühlt.

2.4.3 LightCycler-Technik

Das LightCycler-System beinhaltet zwei funktionelle Komponenten, die Thermocycler-Einheit und die Fluoreszenz-Meßeinheit. Die Reaktion findet in 32 Glaskapillaren statt, die gleichzeitig als Küvetten für die Fluoreszenzmessung dienen. Um eine Punktmutation nachzuweisen, werden zwei spezifische Oligonukleotidsonden eingesetzt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C wird das Reaktionsgemisch auf 45 °C abgekühlt. Dabei lagern sich die zwei Oligonukleotidsonden an ihre Zielsequenz im DNA-Fragment. Die erste Sonde, die so genannte Donorsonde, ist mit dem Fluorophor Fluoreszein gekoppelt. Die zweite Sonde, die so genannte Akzeptorsonde, ist mit Farbstoff LightCycler-Red-640 (bzw. -705) gekoppelt. Sind die beiden Sonden an den Zielabschnitt der genomischen DNA gebunden, dann liegen die Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander. Dabei wird das Fluoreszein von der Lichtquelle des LightCycler-Gerätes, einer Hochleistungsdiode, welche blaues Licht emittiert, das nach Passage eines Filters und eines Kollimators eine Wellenlänge von 470 nm hat, angeregt. Ein Teil dieser Anregungsenergie wird auf das LightCycler-Red-640 (bzw. -705) übertragen, welches hierdurch ebenfalls angeregt wird. Nur wenn die Oligonukleotidsonden an ihre Zielsequenz binden, ist der Abstand zwischen den beiden

fluoreszierenden Farbstoffen so gering, dass es zu einem Energietransfer zwischen den beiden Elementen kommt (FRET = „fluorescence resonance energy transfer“). Die Strahlung des LightCycler-Red-640 (bzw. -705) wird vom LightCycler-Gerät gemessen (Abbildung 4).

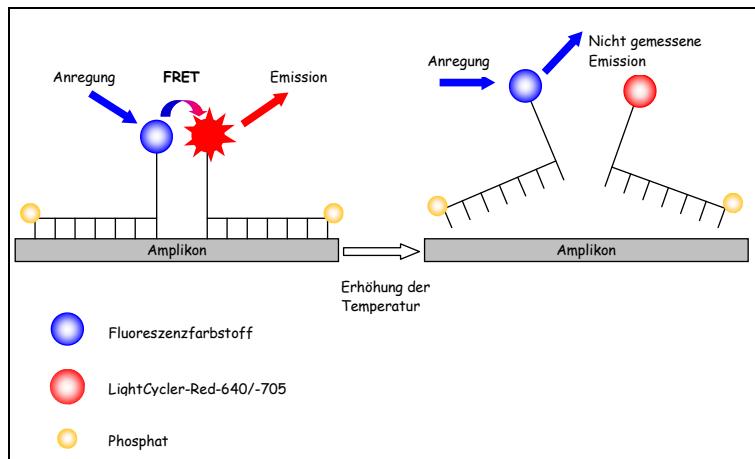


Abbildung 4: Prinzip des FRET bei Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz

Zum Nachweis von genetischen Varianten wird die Temperatur schrittweise erhöht und zeitgleich die Fluoreszenz gemessen. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Ablösung der Sonden von der untersuchten DNA abnimmt, kann eine Schmelzkurve aufgezeichnet werden. Im Vergleich zum Hybrid aus homologen Sequenzen hat das Hybridisierungsprodukt aus Sonde und DNA-Sequenz eine um einige Grad niedrigeren Schmelzpunkt, wenn die Sequenzen nicht vollständig übereinstimmen. Eine einzige unterschiedliche Base in der untersuchten Zielfrequenz bewirkt eine schlechtere Hybridisierung und so eine um einige Grad Celsius nach links verschobene Schmelzkurve. Deshalb können Wildtyp-Formen von homozygoten und heterozygoten Genvariationen anhand verschiedener Schmelztemperaturen unterschieden werden, die in Kurvenform durch die LightCycler-Software dargestellt werden.

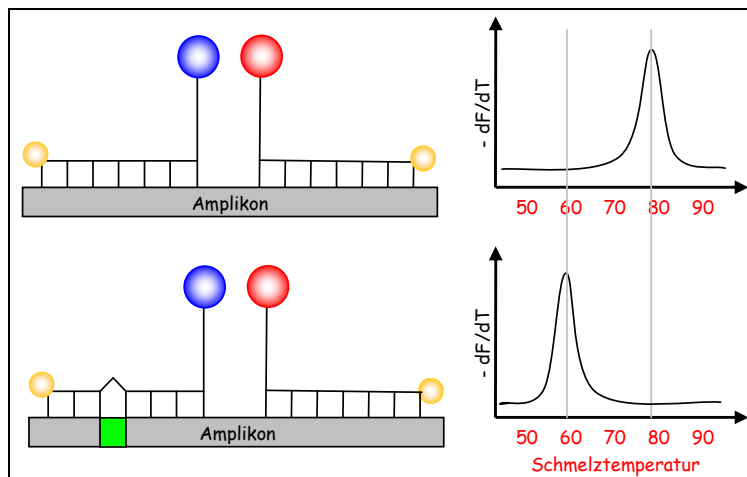


Abbildung 5: Die Schmelzkurve in Abhängigkeit der Übereinstimmung der Sondensequenz

Trägt die Sensorsonde die komplementäre Sequenz des DNA-Segments in mutierter Form, wird sie auch Mutationssonde genannt. Prinzipiell kann die Sonde aber auch die komplementäre Sequenz der Wildtyp-Sequenz tragen.

2.4.4 Nachweis der *HFE*-Gen-Varianten

Zum Nachweis der genetischen Variationen C282Y und H63D wurde jeweils eine Mutationssonde verwendet.

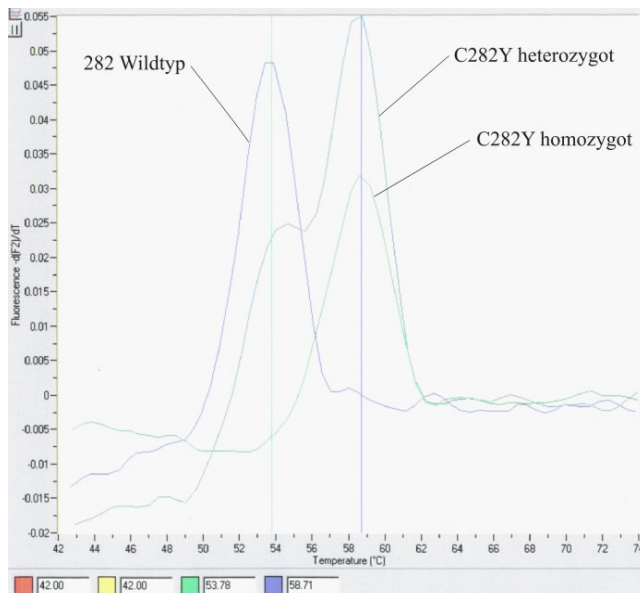


Abbildung 6: Darstellung der Schmelzkurven für die 282-Varianten

Gleichzeitig zur H63D-Variante konnte mit derselben Sonde die S65C-Variante nachgewiesen werden, da die beiden Nukleotidpositionen (187 und 193) sich im Abstand von 6 Nukleotiden voneinander befinden. Da die Oligonukleotidsequenz der verwendeten Sonde zum 65-Wildtyp komplementär war, resultierte bei Vorliegen einer S65C-Variante ein erniedrigter Schmelzpunkt und damit eine veränderte Kurvenform.

Um die Genotypisierung in einem einzigen Ansatz durchführen zu können, wurden die beiden Ankersonden mit zwei verschiedenen Farbstoffen gekoppelt, die parallel im LightCycler detektiert wurden. Zum Nachweis der *HFE*-C282Y-Variante wurde LightCycler-Red-640, und für die *HFE*-H63D-Variante wurde LightCycler-Red-705 verwendet.

Folgende Sondensequenzen wurden verwendet:

Tabelle 8: Sondensequenzen (Position nach GenBank accession #Z92910):

<i>HFE</i> -Mutation	Sondensequenz	Position	Länge (bp)
C282Y	5'-AgA-TAT-ACg-TAC-CAg-gTg-gAg- FL	6712 - 6732	21
	LC640 -CCC-Agg-CCT-ggA-TCA-gCC-CCT-CAT-TgT-gAT-CTG-gg-3'	6735 - 6769	35
H63D/S65C	5'-CTT-gAA-ATT-CTA-CTg-gAA-ACC-CAT-ggA-gTT-Cgg-ggC-TCC- FL	4817 - 4779	39
	LC705 -CAC-ggC-gAC-TCT-CAT-CAT-CAT-AgA-ACA-CgA-ACA-3'	4777 - 4745	33

Für den LightCycler-Sondenansatz wurden jeweils 16 µl von der LC-Red-640 Sonde (0,5 µM) bzw. LC-Red-705 Sonde (0,5 µM) mit 32 µl Fluorescein Sonde (0,5 µM) vermischt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 244 µl aufgefüllt. Zu je 2 µl Sondenansatz wurden 4,5 µl PCR-Produkt gegeben, in der Kapillare gemischt und bei 3000 rpm zentrifugiert.

2.5 Statistische Verfahren

Alle gewonnenen Daten wurden auf der Basis definierter Kriterien in eine elektronische Datenbank eingepflegt. Das Datenmaterial wurde anonymisiert und es wurden Dateien erstellt, welche eine elektronische Datenauswertung ermöglichten.

Nominal und ordinal skalierte Größen wurden anhand von absoluten und prozentualen Häufigkeiten beschreibend in Kontingenztafeln dargestellt bzw. mittels Kreisdiagrammen grafisch veranschaulicht. Die Beschreibung des Alters als quantitative Größe erfolgte anhand von Mittelwert und Median sowie Minimum und Maximum.

Die untersuchten Patientengruppen wurden hinsichtlich ihrer Genotypverteilung (C282Y und H63D) mittels exakten Tests nach Fisher mit der Kontrollgruppe verglichen. Um eine Abhängigkeit zwischen dem Fibrosegrad und dem jeweiligen Genotyp zu untersuchen, wurde ein exakter Chi-Quadrat-Test für linearen Trend eingesetzt. Die Unabhängigkeitshypothesen wurden zum einen für das gesamte Kollektiv getestet und andererseits in Untergruppen.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Da die vorliegende Untersuchung explorativen Charakter hatte, erfolgte keine alpha-Adjustierung aufgrund multiplen Testens, die statistischen Ergebnisse wurden entsprechend interpretiert. Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS für Windows Version 13 (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

3.1.1 Demografische Daten und Diagnosegruppen

Insgesamt wurden 1557 Patienten, die im Zeitraum von 1988 bis 2003 wegen chronischer Lebererkrankungen behandelt worden sind, in die Studie eingeschlossen.

Unter den insgesamt 1557 Patienten befanden sich 831 (53,4%) Männer und 726 (46,6%) Frauen im Alter von 14 bis 87 Jahren (Median 49 Jahre). Das Patientenkollektiv bestand zu 82,0% aus deutschstämmigen Europäern, 6% waren Europäer anderer Herkunft und 11,1% der Patienten waren Nicht-Europäer (7,2% Türken, 2,0% Asiaten, 1,5% Araber, 0,6% Schwarz-Afrikaner).

Es wurden insgesamt 7 Diagnose-Gruppen gebildet: Patienten mit Autoimmunhepatitis (AIH, n=103), Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung (ALD, n=233), Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virusinfektion (HBV, n=201), Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (HCV, n=687), Patienten mit kryptogener Lebererkrankung (CLD, n=67), und Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleberhepatitis (NASH, n=49). Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) sowie Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) wurden in die Gruppe der Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung (PBC/PSC, n=217) zusammengefasst (Tabelle 9).

Tabelle 9: Untersuchte Lebererkrankung, Patientenfallzahlen und demographische Daten

<i>Diagnose</i>	<i>Patienten</i> n	<i>Alter* (Jahre)</i>			<i>Geschlecht / n (%)</i>		<i>Ethnizität / n (%)</i>		
		Median (Mittelw.)	Min.	Max.	männlich	weiblich	Deutsche	andere Europäer	andere
Autoimmunhepatitis (AIH)	103	45 (46)	18	81	32 (31,1%)	71 (68,9%)	87 (84,5%)	7 (6,8%)	9 (8,7%)
Alkoholtoxische Lebererkrankung (ALD)	233	51 (50)	28	67	165 (70,8%)	68 (29,2%)	232 (9,6%)	0	1 (0,4%)
chronische Hepatitis B (HBV)	201	45 (49)	17	76	150 (74,6%)	51 (25,4%)	103 (51,2%)	18 (9,0%)	80 (39,8%)
chronische Hepatitis C (HCV)	687	49 (45)	18	82	366 (53,3%)	321 (46,7%)	585 (81,2%)	56 (8,2%)	73 (10,6%)
Kryptogene Lebererkrankung (CLD)	67	50 (50)	19	74	34 (50,7%)	33 (49,3%)	62 (92,5%)	2 (3%)	3 (4,5%)
Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NASH)	49	45 (45)	22	67	27 (55,1%)	22 (44,9%)	42 (85,7%)	4 (8,2%)	3 (6,1%)
Cholestatische Lebererkrankungen (PBC/PSC)	217	52 (52)	14	87	57 (26,3%)	160 (73,7%)	206 (94,9%)	7 (3,2%)	4 (1,8%)
Insgesamt	1557	49 (49)	14	87	831 (53,4%)	726 (46,6%)	1290 (82,9%)	94 (6,0%)	173 (11,1%)

*Alter bei Diagnosestellung bzw. bei Lebertransplantation

3.1.1 Patienten mit Zirrhose, Lebertransplantation und HCC

Für 857 Patienten (55,5% des Gesamtkollektivs) wurde an Hand der jeweils erhobenen klinischen, laborchemischen, bildmorphologischen oder histologischen Befunde nach oben definierten Diagnosekriterien die Diagnose einer Leberzirrhose gestellt. Der Anteil der zirrhotischen Patienten betrug in der Gruppe der Patienten mit Autoimmunhepatitis 51,5%, in der Gruppe der Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung 96,6%, in der Gruppe der Patienten mit HBV-Infektion 62,7%, in der Gruppe der Patienten mit HCV-Infektion 36,5%, in der Gruppe der Patienten mit kryptogener Lebererkrankung 97,0%, in der Gruppe der Patienten mit NASH 2,0% und in der Gruppe der Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung 62,7%. Von den 1557 in die Studie eingeschlossenen Patienten hatten 681 Patienten (43,7% des Gesamtkollektivs) eine Lebertransplantation (LTX) erhalten. Für 109 Patienten (7% der Gesamtkollektivs) wurde die Diagnose eines HCC gestellt. Der Anteil der Patienten mit Leberzirrhose, LTX bzw. HCC ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung von Zirrhose, HCC und LTX im Patientenkollektiv

<i>Diagnose</i>	<i>Patienten</i>	<i>Zirrhose*</i>	<i>LTX</i>	<i>HCC</i>
	<i>n</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
Autoimmunhepatitis (AIH)	103	53 (51,5%)	35 (34,0%)	1 (1,0%)
Alkoholtoxische Lebererkrankung (ALD)	233	225 (96,6%)	203 (87,1%)	29 (12,4%)
chronische Hepatitis B (HBV)	201	126 (62,7%)	119 (59,2%)	16 (8,0%)
chronische Hepatitis C (HCV)	687	251 (36,5%)	168 (24,6%)	53 (7,7%)
Kryptogene Lebererkrankung (CLD)	67	65 (97,0%)	55 (82,1%)	9 (13,4%)
Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NASH)	49	1 (2,0%)	1 (2,0%)	0
Cholestatische Lebererkrankungen (PBC/PSC)	217	136 (62,7%)	99 (45,6%)	1 (0,5%)
Insgesamt	1557	857 (55,5%)	681 (43,7%)	109 (7,0%)

*Zirrhose klinisch oder histologisch bestätigt

3.2 Häufigkeitsverteilung der *HFE*-Gen-Varianten

3.2.1 Häufigkeitsverteilung der C282Y-Variante

Insgesamt konnte zwischen dem Gesamtkollektiv der Patienten und Kontrollen kein Unterschied in der Verteilung der C282Y-Variante gefunden werden (exakter Fisher-Test, $p=0,06$). Die beobachtete Genotypverteilung für Patienten und Kontrollen war vergleichbar mit beschriebenen Genotyphäufigkeiten in Mitteleuropa. Die beobachteten Allelhäufigkeiten bei Patienten und Kontrollen befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Für die Gruppe der Patienten mit kryptogener Lebererkrankung war eine Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante im Vergleich zu Kontrollen zu verzeichnen (CLD: CY 14,9%, Kontrollen: CY 6,2%). Diese Assoziation war signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,046$). Für alle anderen Patientengruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden (exakter Fisher-Test, $p>0,05$).

3.2.2 Häufigkeitsverteilung der H63D-Variante

Die Verteilung H63D-Variante zeigte keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (exakter Fisher-Test, $p=0,44$). Auch hier war die beobachtete Genotypverteilung für Patienten und Kontrollen vergleichbar zu beschriebenen Genotyphäufigkeiten der H63D-Variante in Mitteleuropa. Die beobachteten Allelhäufigkeiten bei Patienten und Kontrollen befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Auch für die einzelnen Patientengruppen konnte kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der H63D-Variante im Vergleich mit der Verteilung in Kontrollen nachgewiesen werden (exakter Fisher-Test, $p>0,05$).

Die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilung der C282Y- und der H63D-Varianten sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Die Häufigkeitsverteilung der C282Y- und der H63D-Varianten unter Patienten mit chronischer Lebererkrankung im Vergleich mit Kontrollen

Gruppe	Patienten <i>n</i>	C282Y			P-Wert*	H63D			P-Wert*
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
AIH	103	93,2% (96)	6,8% (7)	0	0,89	75,7% (78)	24,3% (25)	0	0,59
ALD	233	93,6% (218)	6,4% (15)	0	0,75	63,9% (149)	31,8% (74)	4,3% (10)	0,31
HBV	201	96,0% (193)	4,0% (8)	0	0,37	76,6% (154)	21,4% (43)	2,0% (4)	0,33
HCV	687	90,0% (618)	9,9% (68)	0,1% (1)	0,49	74,5% (512)	23,7% (163)	1,7% (12)	0,55
CLD	67	85,1% (57)	14,9% (10)	0	0,046	80,6% (54)	17,9% (12)	1,5% (1)	0,25
NASH	49	93,9% (46)	6,1% (3)	0	1,0	75,5% (37)	24,5% (12)	0	0,93
PBC/PSC	217	94,5% (205)	5,5% (12)	0	0,69	73,7% (160)	22,6% (49)	3,7% (8)	0,13
Insgesamt	1557	92,0% (1433)	7,9% (123)	0,1% (1)	0,06	73,5% (1144)	24,3% (378)	2,2% (35)	0,44
Kontrollen	355	93,2% (331)	6,2% (22)	0,6% (2)		71,8% (255)	26,8% (95)	1,4% (5)	

*im Vergleich zu Kontrollen, exakter Fisher-Test

Diese Ergebnisse wurden nicht für multiples Testen korrigiert und daher nur als Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zu sehen.

3.3 Einfluss des *HFE*-Genstatus auf den Schweregrad der Erkrankung

3.3.1 Genotypverteilung in Abhängigkeit des Fibrosegrads

Bei 1150 Patienten (73,9% des Gesamtkollektivs) konnte bei Leberpunktion, Laparoskopie oder Lebertransplantation Gewebematerial gewonnen und eine Fibrosegrad-Bestimmung an Hand des semiquantitativen Bewertungssystems nach Scheuer durchgeführt werden. Dabei handelte es sich in 48% der Fälle um Gewebematerial von Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (Abbildung 7).

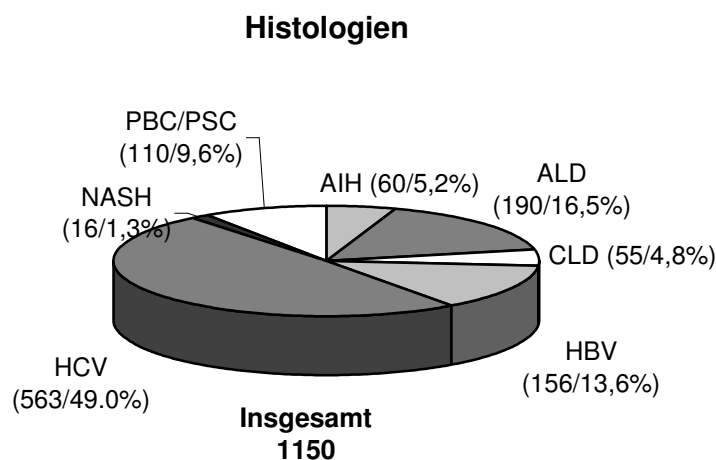


Abbildung 7: Anteile der verschiedenen Grunderkrankungen an der Gesamtheit der Histologien (n/%)

Patienten, bei denen eine Fibrosegrad-Bestimmung durchgeführt werden konnte, wurden je nach Fibrosegrad in 5 Gruppen eingeteilt (Grad 0: 58 Fälle, Grad 1: 201 Fälle, Grad 2: 149 Fälle, Grad 3: 48 Fälle, Grad 4: 694 Fälle) und es wurde die Genotypverteilung der *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D in diesen Gruppen analysiert um einen Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf den Fibrosegrad zu untersuchen. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der *HFE*-Genotyp-Verteilung in den einzelnen Gruppen (Tabelle 12). Auch die Analyse der Genotypverteilung nach steigendem Fibrosegrad mittels exakten Chi-Quadrat-Tests für lineare Trends erbrachte keine signifikante Assoziation ($p=0,13$ bzw. $p=0,20$).

Tabelle 12: Die Häufigkeitsverteilung der C282Y- und der H63D-Varianten in Abhängigkeit des Fibrosegrads

Fibrosegrad	Patienten <i>n</i>	C282Y			<i>P-Wert*</i>	H63D			<i>P-Wert*</i>
		% (<i>n</i>)				% (<i>n</i>)			
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
0	58	98,3% (57)	1,7% (1)	0		74,1% (43)	25,9% (15)	0	
1	201	92,0% (185)	8,0% (16)	0		78,1% (157)	19,9% (40)	2,0% (4)	
2	149	91,3% (136)	8,7% (13)	0		71,1% (106)	26,2% (39)	2,7% (4)	
3	48	95,8% (46)	4,2% (2)	0		81,3% (39)	18,8% (9)	0	
4	694	90,0% (629)	9,4% (65)	0		72,3% (502)	25,2% (175)	2,4% (17)	
Insgesamt	1150	91,6% (1053)	8,4% (8,4)	0	0,13	73,7% (847)	24,2% (278)	2,2% (25)	0,20

*exakter Chi-Quadrat-Test für lineare Trends

3.3.2 Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Zirrhose

Für 857 Patienten (55,5% des Gesamtkollektivs) wurde an Hand der jeweils erhobenen klinischen, laborchemischen, bildmorphologischen und histologischen Befunde nach oben definierten Diagnosekriterien die Diagnose einer Leberzirrhose gestellt.

Um einen möglichen Effekt der *HFE*-Gen-Varianten auf die Progression der Erkrankung zur Leberzirrhose zu untersuchen, wurden die Patienten nach Patienten mit und ohne Leberzirrhose aufgeteilt und deren Genotypverteilung verglichen.

Wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist, fand sich kein Unterschied in der Verteilung der C282Y- und der H63D-Varianten zwischen Patienten mit und ohne Leberzirrhose (exakter Fisher-Test, $p=0,22$ bzw. $p=0,51$). Es konnte auch kein Effekt dieser beiden

Varianten beobachtet werden, wenn die einzelnen Gruppen AIH, HBV sowie PBC/PSC betrachtet wurden. In der Gruppe der Patienten mit HCV-Infektion konnte eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante bei Patienten mit Zirrhose beobachtet werden (keine Zirrhose: CY 8,5%, Zirrhose: CY 12,4%). Diese Assoziation war nach dem exakten Fisher-Test nicht signifikant ($p=0,16$). In den Gruppen ALD, CLD und NASH konnte auf Grund zu geringer Fallzahlen entweder von Patienten ohne bzw. mit Zirrhose kein Vergleich angestellt werden.

Tabelle 13: Vergleich der Genotypverteilung der C282Y- bzw. der H63D-Variante bei Patienten mit und ohne Leberzirrhose

Gruppe	Zirrhose	Patienten n	C282Y			P-Wert (Fisher)	H63D			P-Wert (Fisher)
			CC	CY	YY		HH	HD	DD	
AIH	ja	53	92,5% (49)	7,5% (4)	0	1,0	77,4% (41)	22,6% (12)	0	0,82
	nein	50	94,0% (47)	6,0% (3)	0		74,0% (37)	26,0% (13)	0	
ALD	ja	225	93,3% (210)	6,7% (15)	0		63,6% (143)	32,4% (73)	4,0% (9)	
	nein	8	100% (8)	0	0		75,0% (6)	12,5% (1)	12,5% (1)	
HBV	ja	126	96,0% (121)	4,0% (5)	0	1,0	74,6% (94)	23,0% (29)	2,4% (3)	0,67
	nein	75	96,0% (72)	4,0% (3)	0		80,0% (60)	18,7% (14)	1,3% (1)	
HCV	ja	251	87,6% (220)	12,4% (31)	0	0,16	74,9% (188)	24,3% (61)	0,8% (2)	0,38
	nein	436	91,3% (398)	8,5% (37)	0,2% (1)		74,3% (324)	23,4% (102)	2,3% (10)	
CLD	ja	65	84,6% (55)	15,4% (10)	0		81,5% (53)	16,9% (11)	1,5% (1)	
	nein	2	100% (2)	0	0		50,0% (1)	50,0% (1)	0	
NASH	ja	1	100% (1)	0	0		100% (1)	0	0	
	nein	48	93,8% (45)	6,3% (3)	0		75,0% (36)	25,0% (12)	0	
PBC/PSC	ja	136	93,4% (127)	6,6% (9)	0	0,28	73,5% (100)	22,1% (30)	4,4% (6)	0,83
	nein	81	96,3% (78)	3,7% (3)	0		74,1% (60)	23,5% (19)	2,5% (2)	
Insgesamt	ja	857	91,4% (783)	8,6% (74)	0	0,22	72,3% (620)	25,2% (216)	2,5% (21)	0,51
	nein	700	92,9% (650)	7,0% (49)	0,1% (1)		74,9% (524)	23,1% (162)	2,0% (14)	

3.3.1 Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Lebertransplantation

Bei 681 Patienten (43,7% des Gesamtkollektivs) wurde auf Grund eines progredienten Erkrankungsverlaufs mit Dekompensation der Lebererkrankung eine Lebertransplantation durchgeführt.

Wie der Tabelle 14 zu entnehmen ist, zeigte sich auch hier kein Unterschied in der Verteilung der C282Y- bzw. der H63D-Variante (exakter Fisher-Test, $p=0,22$, bzw. $p=0,44$). Auch in der Subgruppenanalyse ergab sich bis auf die Gruppe der Patienten mit kryptogener Lebererkrankung kein signifikanter Unterschied. In dieser Gruppe konnte eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante in Patienten mit LTX beobachtet werden (LTX: CY 16,4%, keine LTX: CY 8,3%). Diese Assoziation war nach dem exakten Fisher-Test nicht signifikant ($p=0,68$). Auch in der Gruppe der Patienten mit HCV-Infektion konnte eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante in Patienten mit LTX beobachtet werden (LTX: CY 14,2%, keine LTX: CY 8,5%). Auch diese Assoziation ist nach dem exakten Fisher-Test nicht signifikant ($p=0,06$). In der Gruppe NASH wurde auf Grund zu geringer Fallzahlen von Patienten, die eine LTX erhalten hatten, kein Vergleich angestellt.

Tabelle 14: Vergleich der Genotypverteilung der C282Y- bzw. der H63D-Variante von Patienten mit bzw. ohne LTX

Gruppe	LTX	Patienten n	C282Y			P-Wert (Fisher)	H63D			P-Wert (Fisher)
			CC	CY	YY		HH	HD	DD	
AIH	ja	35	88,6% (31)	11,4% (4)	0	0,23	85,7% (30)	14,3% (5)	0	0,14
	nein	68	95,6% (65)	4,4% (3)	0		70,6% (48)	29,4% (20)	0	
ALD	ja	203	93,1% (189)	6,9% (14)	0	0,70	64,5% (131)	32,5% (66)	3,0% (6)	0,06
	nein	30	96,7% (29)	3,3% (1)	0		60,0% (18)	26,7% (8)	13,3% (4)	
HBV	ja	119	95,8% (114)	4,2% (5)	0	1,0	75,6% (90)	21,8% (26)	2,5% (3)	0,86
	nein	82	96,3% (79)	3,7% (3)	0		78,0% (64)	20,7% (17)	1,2% (1)	
HCV	ja	169	85,8% (145)	14,2% (24)	0	0,06	74,6% (126)	24,3% (41)	1,2% (2)	0,88
	nein	518	91,3% (473)	8,5% (44)	0,2% (1)		74,5% (386)	23,6% (122)	1,9% (10)	
CLD	ja	55	83,6% (46)	16,4% (9)	0	0,68	80,0% (44)	18,2% (10)	1,8% (1)	1,0
	nein	12	91,7% (11)	8,3% (1)	0		83,3% (10)	16,7% (2)	0	
NASH	ja	1	100% (1)	0	0		100% (1)	0	0	
	nein	48	93,8% (45)	6,3% (3)	0		75,0% (36)	25,0% (12)	0	
PBC/PSC	ja	99	94,9% (94)	5,1% (5)	0	1,0	69,7% (69)	24,2% (24)	6,1% (6)	0,20
	nein	118	94,1% (111)	5,9% (7)	0		77,1% (91)	21,2% (25)	1,7% (2)	
Insgesamt	ja	681	91,0% (620)	9,0% (61)	0	0,22	72,1% (491)	25,3% (172)	2,6% (18)	0,44
	nein	876	92,8% (813)	7,1% (62)	0,1% (1)		74,5% (653)	23,5% (206)	1,9% (17)	

3.3.1

3.4 Gesonderte Betrachtung der deutschen Patienten mit HCV-Infektion

Wie populationsgenetische Untersuchungen zeigen, wurden stark unterschiedliche Häufigkeiten der *HFE*-Gen-Variante C282Y in verschiedenen Ethnizitäten gefunden. In nicht-europäischen Populationen ist die C282Y-Variante weitaus seltener anzutreffen als in europäischen Bevölkerungen. Da diese Tatsache möglicherweise einen Störfaktor darstellt wurde eine Untergruppe gebildet, in welche ausschließlich Patienten deutscher Abstammung eingeschlossen wurden (HCV deutsch). Es wurden speziell HCV-Patienten ausgewählt, da sie zahlenmäßig die größte Untergruppe bildeten und dazu die meisten Daten in der Literatur vorliegen.

3.4.1 Häufigkeitsverteilung der *HFE*-Gen-Varianten

Wie Tabelle 15 zu entnehmen ist, konnte in dieser Patientengruppe eine Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (HCV deutsch: CY 9,9%, Kontrollen: CY 6,2%), diese Assoziation war signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,013$). Für die Verteilung H63D-Variante wurden keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen gefunden (HCV deutsch: HD 24,7%; Kontrollen: HD 26,8%, $p=0,69$).

Tabelle 15: Die Häufigkeitsverteilung der *HFE*-Gen-Varianten bei deutschen HCV-Patienten und Kontrollen

Gruppe	Patienten <i>n</i>	C282Y			P-Wert*	H63D			P-Wert*
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
HCV deutsch	558	88,7% (495)	11,1% (62)	0,2% (1)	0,013	73,3% (409)	24,7% (138)	2,0 (11)	0,69
Kontrollen	355	93,2% (331)	6,2% (22)	0,6% (2)		71,8% (255)	26,8% (95)	1,4% (5)	

*exakter Fisher-Test

3.4.2 Einfluss des *HFE*-Genstatus auf den Schweregrad der Erkrankung

3.4.2.1 Genotypverteilung in Abhängigkeit des Fibrosegrads

Auch in dieser Untergruppe wurde die Genotypverteilung der *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D in Abhängigkeit des Fibrosegrads bestimmt (Grad 0: 30 Fälle, Grad 1: 124 Fälle, Grad 2: 86 Fälle, Grad 3: 23 Fälle, Grad 4: 190 Fälle). Dabei konnte kein Unterschied in der Verteilung der C282Y- und der H63D-Variante in den einzelnen Gruppen gefunden werden (Tabelle 16). Auch die Analyse der Genotypverteilung nach steigendem Fibrosegrad mittels des exakten Chi-Quadrat-Tests für lineare Trends erbrachte keine signifikante Assoziation ($p=0,21$ bzw. $p=0,61$).

Tabelle 16: Die Häufigkeitsverteilung der *HFE*-Gen-Varianten in Abhängigkeit des Fibrosegrads

Fibrosegrad	Patienten <i>n</i>	C282Y			P-Wert*	H63D			P-Wert*
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
0	30	96,7% (29)	3,3% (1)	0		76,7% (23)	23,3% (7)	0	
1	124	88,7% (110)	11,3% (12,8)	0		73,4% (91)	24,2% (30)	2,4% (3)	
2	86	87,2% (75)	12,8% (11)	0		72,1% (62)	23,3% (20)	4,7% (4)	
3	23	95,7% (22)	4,3% (1)	0		69,6% (16)	30,3% (7)	0	
4	190	85,8% (163)	14,2% (27)	0		75,3% (143)	24,2% (46)	0,5% (1)	
Insgesamt	453	88,1% (399)	11,9% (54)	0	0,21	74,0% (335)	24,3% (110)	1,8% (8)	0,61

*exakter Chi-Quadrat-Test für lineare Trends

3.4.2.2 Genotypverteilung bei Patienten mit bzw. ohne Zirrhose/LTX

Um in dieser Untergruppe einen möglichen Effekt der *HFE*-Gen-Varianten auf die Progression der Erkrankung zur Leberzirrhose bzw. auf das Erreichen des Stadiums der Dekompensation der Lebererkrankung mit Indikation zur Lebertransplantation zu untersuchen, wurden das Patientenkollektiv nach Patienten mit und ohne Leberzirrhose

bzw. mit und ohne LTX aufgeteilt (Tabelle 17).

Die Analyse zeigte, dass eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante in Patienten mit Zirrhose bzw. LTX beobachtet werden kann (Zirrhose: CY 13,0%, keine Zirrhose: CY 9,9%; LTX: CY 14,5%, keine LTX: CY 9,9%). Diese Beobachtungen waren nach dem exakten Fisher-Test allerdings nicht signifikant ($p=0,39$ bzw. $p=0,29$). In keinem Fall konnte eine Assoziation bei der H63D-Variante beobachtet werden.

Tabelle 17: Vergleich der Genotypverteilung bei deutschen HCV-Patienten mit und ohne Leberzirrhose/Lebertransplantation

Gruppe	Patienten n	C282Y			P-Wert*	H63D			P-Wert*
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
Zirrhose	ja	215	87,0% (187)	13,0% (28)	0	75,3% (162)	24,2% (52)	0,5% (1)	0,12
	nein	343	89,8% (308)	9,9% (34)	0,3% (1)	72,0% (247)	25,1% (86)	2,9% (10)	
LTX	ja	145	85,5% (124)	14,5% (21)	0	77,2% (112)	22,1% (32)	0,7% (1)	0,33
	nein	413	89,8% (371)	9,9% (41)	0,2% (1)	71,9% (297)	25,7% (106)	2,4% (10)	

*exakter Fisher-Test

3.5 Einfluss des *HFE*-Gen-Status auf die Entwicklung eines HCC

Für 109 Patienten (7,0% des Gesamtkollektivs) wurde die Diagnose eines HCC gestellt. Nur in zwei Fällen trat das HCC in nicht zirrhotisch vorgeschädigter Leber auf. Es handelte sich in 48,6% der Fälle um HCC in Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion. Die Verteilung ist in Abbildung 8 dargestellt.

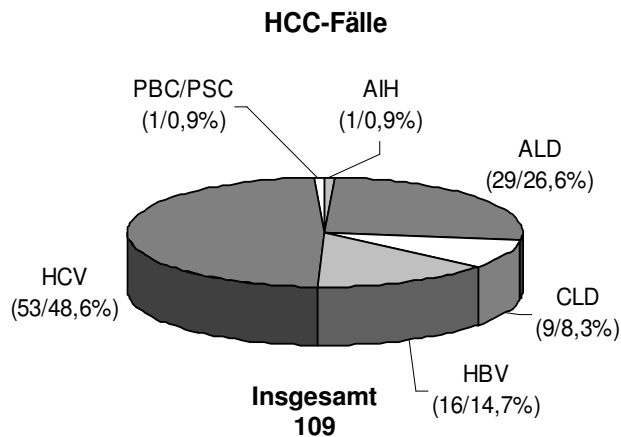


Abbildung 8: Anteile der Grunderkrankungen an der Gesamtheit der HCC-Fälle (n/%)

Um einen möglichen Effekt der *HFE*-Gen-Varianten auf die Entwicklung eines HCC zu untersuchen wurde das gesamte Patientenkollektiv nach Patienten mit HCC und Patienten mit Leberzirrhose ohne HCC aufgeteilt und die *HFE*-Genotypverteilung in diesen Gruppen verglichen. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, konnte kein Unterschied in der Verteilung der C282Y- und der H63D-Gen-Variante zwischen Patienten mit HCC und Patienten mit alleiniger Leberzirrhose festgestellt werden (exakter Fisher-Test, $p=0,58$ bzw. $p=0,57$). Auch wenn Patienten mit HCC mit Kontrollen verglichen wurden, unterschied sich die Verteilung der C282Y- und der H63D-Gen-Variante nicht signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,31$ bzw. $p=0,96$).

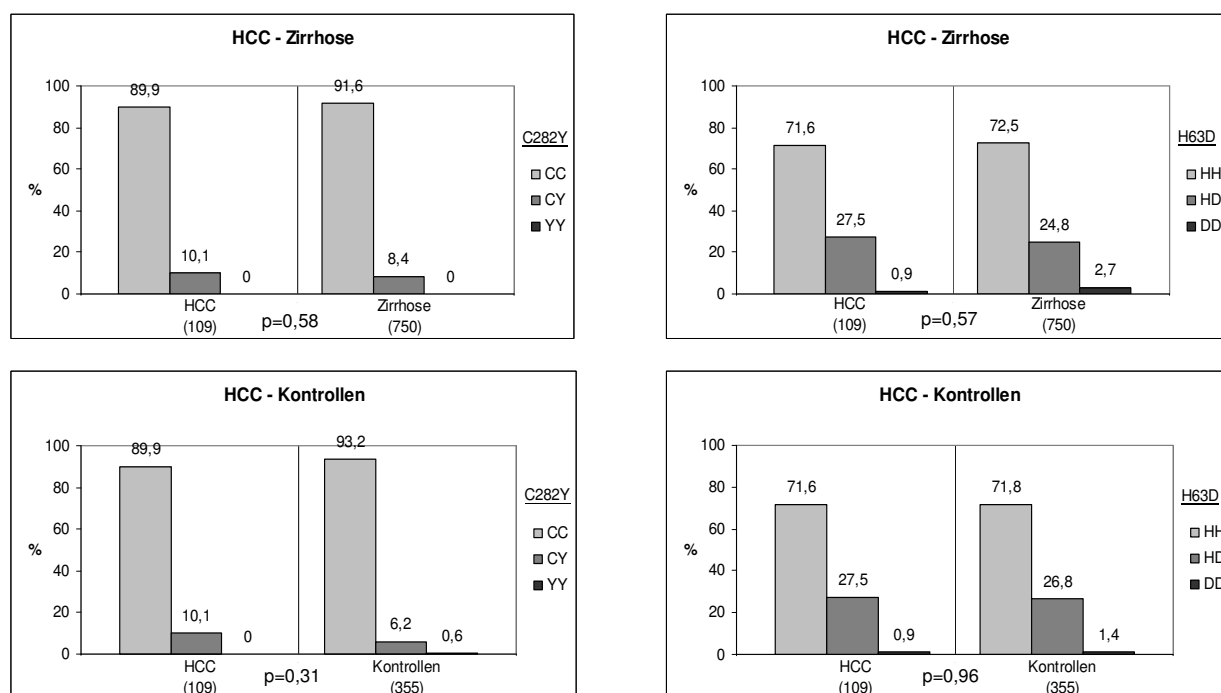


Abbildung 9: Vergleich der *HFE*-Genotypverteilung zwischen HCC-Patienten und Zirrhose-Patienten bzw. zwischen HCC-Patienten und Kontrollen, exakter Fisher-Test

Um einen möglichen Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten in Abhängigkeit der Grunderkrankung zu untersuchen wurden die Analysen auf die zwei größten Untergruppen ALD und HCV herunter gebrochen (Tabelle 18). Es konnte in der Gruppe von Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung kein Effekt beobachtet werden. In der HCV-Gruppe konnte eine Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante bei Patienten mit HCC in Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden (HCC: CY 15,1%, Kontrollen: 6,2%). Diese Beobachtung war nach dem exakten Fisher-Test jedoch nicht signifikant ($p=0,08$).

Tabelle 18: Vergleich der *HFE*-Genotypverteilung der Gruppen ALD und HCV mit Kontrollen

<i>HCC-Gruppe</i>	<i>Patienten</i> <i>n</i>	<i>C282Y</i>			<i>P-Wert*</i>	<i>H63D</i>			<i>P-Wert*</i>
		% (<i>n</i>)				% (<i>n</i>)			
		CC	CY	YY		HH	HD	DD	
ALD	29	93,1% (27)	6,9% (2)	0	0,75	69,0% (20)	31,0% (9)	0	0,78
HCV	53	84,9% (45)	15,1% (8)	0	0,08	67,9% (36)	30,2% (16)	1,9% (1)	0,64
Kontrollen	355	93,2% (331)	6,2% (22)	0,6% (2)		71,8% (255)	26,8% (95)	1,4% (5)	

*im Vergleich zu Kontrollen, exakter Fisher-Test

4 Diskussion

Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, warum beispielsweise bestimmte Patienten mit übermäßigem Alkoholkonsum nach einigen Jahren eine Leberzirrhose entwickeln, während andere, trotz vergleichbarer Exposition, davon verschont bleiben. Klinische Beobachtungen zeigen auch, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion eine langsame, mittlere oder schnelle Progression der Erkrankung zur Leberzirrhose entwickeln können (Poynard *et al.*, 1997). Dies veranlasst dazu, die Hintergründe der Progredienz chronischer Lebererkrankungen näher zu beleuchten.

Bekannte Faktoren, die auf die Progredienz chronischer Lebererkrankungen Einfluss nehmen, sind das Alter und Geschlecht des Patienten und die Dauer der Erkrankung. Im Sinne eines multifaktoriellen Geschehens können aber auch verschiedene veränderte Gene, welche bei der Interaktion mit der Umwelt eine Schlüsselrolle spielen, als Ursache einer schnellen Progredienz zu Leberzirrhose oder HCC angesehen werden.

Seit der Identifizierung des *HFE*-Gens im Jahre 1996 (Feder *et al.*, 1996) wurden einige Erkenntnisse zur Genotyp-Phänotyp-Assoziation der *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D gewonnen. Während die homozygote C282Y-Variante Hauptursache für die klassische hereditäre Hämochromatose ist, weisen Individuen mit einer heterozygoten C282Y- oder homozygoten H63D-Variante unter Umständen lediglich eine subklinische Erhöhung der hepatischen Eisenkonzentration auf (Beutler *et al.*, 2000; Beutler *et al.*, 2003). Ionisiertes Eisen induziert unter anderem die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, welche zu einer Schädigung von DNA oder Zellstrukturen führen (Britton und Bacon, 1994). Möglicherweise moduliert die hepatische Eiseneinlagerung in Folge der *HFE*-Gen-Varianten über diesen Pathomechanismus die Entzündungsaktivität und den Fibrosegrad der Leber bei Vorliegen einer chronischen Lebererkrankung. Darüber hinaus kann ein karzinogener Effekt durch Eisenakkumulation auch für die Entwicklung des HCC eine wichtige Rolle spielen. Eine verstärkte hepatische Eisenakkumulation wurde insbesondere bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion von verschiedenen Autoren beschrieben (Piperno *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2000). Es ist bis heute unklar, ob Alterationen im *HFE*-Gen

dafür verantwortlich sind.

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese untersucht, ob die *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D die Entwicklung und Progression chronischer Lebererkrankungen und die Entwicklung eines HCC negativ beeinflussen. Im Rahmen von Subgruppenanalysen sollten Grunderkrankungen benannt werden, die bei Vorliegen einer *HFE*-Gen-Variante ein besonders hohes Risiko für eine Progredienz zu Leberzirrhose oder HCC haben und von einer veränderten Therapie profitieren könnten.

4.1 Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf die Entwicklung und Progression chronischer Lebererkrankungen

4.1.1 Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden 1557 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Die Frage, ob *HFE*-Gen-Varianten im gesamten Kollektiv der Patienten mit chronischen Lebererkrankungen gehäuft auftreten und damit genetische Risikofaktoren darstellen, muss an Hand dieser Studie negativ beantwortet werden. Die heterozygote C282Y-Variante tritt hier nicht häufiger auf als in Kontrollen (Patienten: CY 7,9%, Kontrollen: CY 6,2%, $p=0,06$). Auch das Vorliegen einer Zirrhose oder LTX war nicht mit der *HFE*-Gen-Variante assoziiert. Gegen die Hypothese, dass die *HFE*-Gen-Varianten für den Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen eine wichtige Rolle spielen, spricht auch die Beobachtung, dass keine eindeutige Assoziation von Fibrosegrad und *HFE*-Gen-Varianten nachgewiesen wurde. Allerdings handelte es sich hinsichtlich der verschiedenen Grunderkrankungen um eine inhomogene Patientengruppe. In der Literatur wurden insbesondere Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion näher auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Daher wurden die einzelnen Untergruppen gesondert analysiert.

4.1.2 Patienten mit Autoimmunhepatitis

Bislang wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der C282Y-Variante und der

Autoimmunhepatitis erst in einer Studie gefunden (Höhler *et al.*, 2000). In dieser Untersuchung wurde eine Überrepräsentanz des heterozygoten C282Y-Genotyps in Patienten mit Autoimmunhepatitis (17,2%) in Vergleich zu Kontrollen festgestellt (6,4%). Zeichen einer höhergradigen Fibrose wurde in C282Y-Heterozygoten allerdings nicht gefunden.

In der vorliegenden Studie wurden 103 Patienten mit Autoimmunhepatitis auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Der Anteil an heterozygoten C282Y-Trägern betrug 6,8%, der der H63D-Träger 24,3%, was etwa der Verteilung im Kontrollkollektiv entsprach. Analyierte man den Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf den Schweregrad der Erkrankung, indem man die Genotypverteilung zwischen Patienten mit Zirrhose (bzw. LTX) und Patienten ohne Zirrhose (bzw. LTX) miteinander verglich, so fand sich auch hier keine Assoziation.

Insgesamt lässt sich auf Grund der Inkonsistenz der Studienergebnisse sagen, dass die untersuchte Anzahl der Patienten mit Autoimmunhepatitis zu klein ist, um einen Einfluss von *HFE*-Gen-Varianten auf die Erkrankung zu untersuchen.

4.1.3 Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung

Pathogenetisch führt chronischer Alkoholkonsum zur Induktion des Cytochrom-P-450-abhängigen mikrosomalen Ethanoloxidierenden Systems (MEOS). Der gesteigerte O₂-Verbrauch durch das MEOS führt zu läppchenzentraler Hypoxie. In Folge einer verminderten Oxidierung von Fettsäuren entwickelt sich eine Fettleber. Das beim Alkoholabbau entstehende Azetaldehyd wirkt zudem hepatotoxisch.

Ganne-Carrie *et al.* beschrieben, dass auch eine erhöhte hepatische Eisenakkumulation, unabhängig von ihrer Ursache, den Verlauf der alkoholtoxischen Lebererkrankung negativ beeinflussen kann (Ganne-Carrie *et al.*, 2000). Grove *et al.* untersuchten neben dem Lebereisenstatus auch den *HFE*-Gen-Status von 257 Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung und verglichen ihn mit 117 gesunden Kontrollen (Grove *et al.*, 1998). Die Autoren fanden keine signifikanten Unterschiede in der *HFE*-Genotypverteilung bei Patienten versus Kontrollen. Weder das Vorliegen einer C282Y- noch einer H63D-Heterozygotie hatte einen Einfluss auf den hepatischen Eisenstatus

oder auf das Vorliegen einer verstärkten Leberschädigung.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir 233 Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung auf ihren *HFE*-Gen-Status. Der Anteil an heterozygoten Trägern der C282Y-Variante betrug hier 6,4%, der der H63D-Variante 31,8%. Dies entsprach etwa der Verteilung im Kontrollkollektiv. Analyierte man den Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf den Schweregrad der Erkrankung in dem man die Genotypverteilung zwischen Patienten mit Zirrhose (bzw. LTX) und Patienten ohne Zirrhose (bzw. LTX) miteinander verglich, so konnte auch hier keine Assoziation festgestellt werden. Das Vorliegen einer *HFE*-Gen-Variante erklärt also nicht, warum einige Personen mit erhöhtem Alkoholkonsum eine alkoholtoxische Lebererkrankung entwickeln oder eine stärkere Krankheitsprogression präsentieren als andere, die den gleichen Konsum aufweisen. Hingegen wurde für andere genetische Alterationen, die für den Ethanolmetabolismus (z.B. ADH2/3, ALDH2, Cyp2E1) oder als Antioxidant (MnSOD) von Bedeutung sind, über einen solchen Zusammenhang berichtet (Wasmuth *et al.*, 2003). Nicht alle diese beschriebenen Assoziationen ließen sich in nachfolgenden Studien reproduzieren.

4.1.4 Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virusinfektion

Eine Akkumulation von Eisen in der Leber tritt bei der Hepatitis B-Virusinfektion im Unterschied zur Hepatitis C-Virusinfektion per se nur in geringem Maße auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass erhöhte hepatische Eisenwerte mit einer höheren Entzündungsaktivität der Hepatitis B-Viruserkrankung korrelierten (Martinelli *et al.*, 2004). Es gibt nur wenige Studien, welche explizit die Bedeutung der *HFE*-Gen-Varianten für den Schweregrad der Hepatitis B-Viruserkrankung untersucht haben.

In einer kleineren Studie untersuchten Martinelli *et al.* 81 nicht-zirrhatische Patienten mit Hepatitis B-Virusinfektion in Hinblick auf ihren serologischen und hepatischen Eisenstatus sowie auf die Entzündungsaktivität und Progression der Lebererkrankung und korrelierten diese Parameter mit dem vorliegenden *HFE*-Gen-Status (C282Y und H63D) (Martinelli *et al.*, 2004). In dieser Studie fand man zwar eine positive Assoziation zwischen Eisenstatus und Aktivität bzw. Progression der Lebererkrankung, der vorliegende *HFE*-Genotyp hatte jedoch keinen Einfluss, weder auf den hepatischen

Eisenstatus noch auf die Entzündungsaktivität oder die Progression der Erkrankung. In einer iranischen Studie mit 344 Patienten konnte nicht einmal eine Assoziation zwischen *HFE*-Gen-Varianten und erhöhten Eisenwerten nachgewiesen werden. Einzig die H63D-Variante stand mit einer erhöhten hepatischen Fibrose bei Patienten mit Hepatitis B-Virusinfektion im Zusammenhang (Ghaziani *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Studie wurden 201 Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virusinfektion auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Der Anteil an heterozygoten Trägern der C282Y-Variante betrug hier 4,0%, der der H63D-Variante 21,4%. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde also auch hier nicht gefunden. Analysierte man den Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf den Schweregrad der Erkrankung, so konnte auch hier keine Assoziation festgestellt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur vorbeschriebene Vermutung, dass *HFE*-Gen-Varianten keinen Einfluss auf die Progression der Lebererkrankung bei chronischer Hepatitis B-Virusinfektion besitzen. Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zum Teil beobachtete Eisenakkumulation der Leber bei Hepatitis B-Virusinfektion (Martinelli *et al.*, 2004) möglicherweise auf eine viral bedingte Entzündungsaktivität zurückzuführen ist und nicht auf einen Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten.

4.1.5 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

Erhöhte Eisenwerte der Leber wurden schon mehrfach bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion beschrieben (Piperno *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2000). Darüber hinaus stehen erhöhte hepatische Eisenparameter mit einer höheren inflammatorischen Aktivität und einer beschleunigten Progression der Lebererkrankung in Zusammenhang (Beinker *et al.*, 1996). Eine verstärkte Eisenakkumulation scheint auch das Ansprechen einer Hepatitis C-Virusinfektion auf eine Interferontherapie herabzusetzen (Distante *et al.*, 2002). Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Eisendepletion mittels Aderlasstherapie einen positiven Effekt auf den Verlauf der Erkrankung hat (Yano *et al.*, 2002). Die Viruselimination bleibt davon allerdings unbeeinflusst. Bis heute ist die Frage, ob genetische Faktoren wie *HFE*-Gen-Varianten für die beobachteten erhöhten hepatischen Eisenparameter verantwortlich sind,

Gegenstand von Forschungsbemühungen. Im Kontext der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion bei Trägern einer *HFE*-Gen-Variante könnte das Zusammentreffen zweier profibrogener Stimuli zu einer raschen Progression der Lebererkrankung beitragen. Es wäre auch denkbar, dass das Virus vorzugsweise Zellen mit erhöhtem Eisengehalt befällt bzw. dass die Virusreplikation in solchen Zellen begünstigt ist (Kakizaki *et al.*, 2000).

Insgesamt sind bisher mindestens elf Studien aus unterschiedlichen Regionen der Welt zur Bedeutung von *HFE*-Gen-Varianten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion durchgeführt worden. Zu der Frage, ob und wie Alterationen im *HFE*-Gen den Schweregrad der Lebererkrankung bei Patienten mit Hepatitis C-Virusinfektion beeinflussen, liefern sie diskrepante Ergebnisse (Tabelle 19).

Tabelle 19: Ausgewählte Studienergebnisse im Vergleich

Studie/Land	n	Bemerkungen	Häufigkeiten		Assoziation*
			C282Y	H63D	
(Smith <i>et al.</i> , 1998)/England	137	nur C282Y bestimmt	Genotyp CY: 7,3%		ja
(Martinelli <i>et al.</i> , 2000)/Brasilien	135	nur männliche Patienten	Genotyp CY: 4,4%	Genotyp HD: 20,7% Genotyp HD: 3,7%	ja
(Erhardt <i>et al.</i> , 2003)/Deutschland	401	nur Angabe von Allelhäufigkeiten	Allel Y: 6,95%	Allel D: 14,75%	ja, auch H63D
(Geier <i>et al.</i> , 2004)/Deutschland	166	nur Angabe von Allelhäufigkeiten	Allel Y: 4,2%	Allel D: 21,3%	ja, auch H63D
(Hezode <i>et al.</i> , 1999)/Frankreich	209	Pat. mit decomp. Zirrhose ausgeschlossen	Genotyp CY: 9,1%	Genotyp HD: 18,2% Genotyp DD: 4,3%	nein
(Kazemi-Shirazi <i>et al.</i> , 1999)/Österreich	184		Genotyp CY: 7,6%	Genotyp HD: 19,9% Genotyp DD: 1,6%	nein
(Thorburn <i>et al.</i> , 2002)/England	164		Genotyp CY: 15,8%	Genotyp HD: 20,1% Genotyp DD: 2,4%	nein

*Assoziation von *HFE*-Gen-Varianten und Leberfibrose/-zirrhose

In mindestens sieben Untersuchungen wurde eine positive Assoziation der

heterozygoten C282Y-Variante mit einer Progression der Lebererkrankung nachgewiesen (Smith *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2000; Bonkovsky *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2003; Tung *et al.*, 2003; Gehrke *et al.*, 2003; Geier *et al.*, 2004). So konnte in einer englischen Studie von 1998 mit 137 Teilnehmern bei Patienten mit *HFE*-Gen-Varianten eine vermehrte Eisenablagerung in Hepatozyten und eine verstärkte Fibrosierung der Leber nachgewiesen werden. Das Vorliegen einer Leberfibrose korrelierte stark mit dem Vorliegen der C282Y-Variante (Smith *et al.*, 1998). Erhardt *et al.* fanden in einer größeren deutschen Studie mit 401 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion eine positive Assoziation zwischen der heterozygoten C282Y-Variante (im schwächeren Ausmaß auch für die H63D-Variante) und dem Vorliegen einer Leberfibrose bzw. -zirrhose. Sie konnten zeigen, dass mit dem Schweregrad der Lebererkrankung auch die Allelfrequenzen der C282Y- und der H63D-Varianten anstiegen (Erhardt *et al.*, 2003).

Einige andere Untersuchungen hingegen zeigten keine Assoziation der *HFE*-Gen-Varianten mit einer Progression der Lebererkrankung (Hezode *et al.*, 1999; Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999; Negro *et al.*, 2000; Pirisi *et al.*, 2000; Thorburn *et al.*, 2002; Valenti *et al.*, 2007). In einer französischen Studie mit 209 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion konnte zwar eine positive Assoziation zwischen hepatischer Eisenakkumulation und Fibrosegrad nachgewiesen werden, diese Parameter korrelierten aber nicht mit dem Vorliegen einer *HFE*-Gen-Variante (Hezode *et al.*, 1999). Kazemi-Shirazi *et al.* untersuchten in einer österreichischen Studie das Stadium der Leberfibrose und den *HFE*-Gen-Status von 184 Patienten mit Hepatitis C-Virusinfektion und konnten zeigen, dass sich das Stadium der Leberfibrose in Patienten mit oder ohne *HFE*-Gen-Alteration nicht voneinander unterschied und dass die C282Y- und die H63D-Allelfrequenz bei den untersuchten Patienten nicht von gesunden Kontrollpersonen differierte (Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999). Auch in einer Studie mit 164 schottischen Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion konnte kein Zusammenhang zwischen *HFE*-Gen-Alterationen und erhöhten Eisenparametern im Serum oder in der Leber gefunden werden. Auch das Fibrosestadium der Patienten war nicht mit *HFE*-Gen-Alterationen assoziiert (Thorburn *et al.*, 2002). Auch in einer aktuellen italienischen Studie mit 143 Patienten mit Hepatitis C-Virusinfektion konnte keine erhöhte Häufigkeit

der *HFE*-Gen-Varianten im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Valenti *et al.*, 2007).

Da die Studien-Populationen teilweise sehr klein waren und geringe Fallzahlen die Aussagekraft der Untersuchung schmälern, müssen manche Studienergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Insgesamt zeigen die diskrepanten Ergebnisse der zahlreichen Studien, die zu dieser spezifischen Fragestellung durchgeführt wurden, dass ein eindeutiger Effekt der C282Y-Variante durch Eisenüberladung hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung in Frage gestellt werden muss, bzw. dieser allenfalls schwach ist und daher durch andere Einflussfaktoren möglicherweise leicht verschleiert wird. Weiterhin kann die regional unterschiedliche Gewichtung von ätiologischen Faktoren (Genotyp des Hepatitisvirus, Alkoholkonsum, Eisenaufnahme mit der Nahrung, Aflatoxin B1 u. a.) im Zusammenhang mit der jeweils vorgefundenen Genotypverteilung (im Sinne eines Risikoprofils) zumindest teilweise die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der *HFE*-Gen-Varianten als Risikofaktoren für die Leberzirrhose erklären.

In der vorliegenden Studie wurde die in der Literatur bisher unerreichte Anzahl von 687 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Die Häufigkeit des heterozygoten C282Y-Genotyps betrug 9,9%, dies liegt über den Häufigkeiten, die Smith *et al.* bzw. Erhardt *et al.* beschrieben haben, aber noch unterhalb der Angaben der englischen Studie von Thorburn *et al.* (CY: 15,8%). Im Vergleich zu Kontrollen konnte eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante nachgewiesen werden (HCV: 9,9% vs. Kontrollen: 6,2%), allerdings war diese Beobachtung nicht signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,49$). Innerhalb der Gruppe wurde eine leichte Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante in Patienten mit Zirrhose im Vergleich zu Patienten ohne Zirrhose beobachtet (Zirrhose: CY 12,4%, keine Zirrhose: CY 8,5%). Auch diese Assoziation war nicht signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,16$). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Hezode *et al.*, Kazemi-Shirazi *et al.* und Thorburn *et al.*, welche keinen Effekt der C282Y-Variante auf den Schweregrad der Erkrankung finden konnten. Betrachtet man HCV-Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose mit Indikation zur LTX, lässt sich auch hier nur ein allenfalls schwacher Effekt der heterozygoten C282Y-Variante

beobachten (LTX: CY 14,2%, keine LTX: CY 8,5%, exakter Fisher-Test: $p=0,06$). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Tung *et al.*, welche keinen Effekt der *HFE*-Gen-Variante bei der Entwicklung einer dekompensierten („end-stage“) Leberzirrhose bei HCV-Patienten finden konnten (Tung *et al.*, 2003).

Anders als bei Erhardt *et al.* (Erhardt *et al.*, 2003) sowie bei Geier *et al.* (Geier *et al.*, 2004) konnte in der vorliegenden Studie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion auch kein Einfluss der H63D-Variante auf die Inzidenz oder den Schweregrad der Erkrankung im Sinne einer Leberzirrhose oder einer dekompensierten Lebererkrankung mit Indikation zur LTX gefunden werden. Diese Beobachtung steht jedoch im Einklang mit der in einigen anderen Studien vorgeschriebenen untergeordneten Rolle der H63D-Variante (Hezode *et al.*, 1999; Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999).

Die unterschiedliche Verteilung der C282Y-Variante in Populationen unterschiedlicher Ethnizität mag die Inkonsistenz mancher Studienergebnisse teilweise erklären. In nicht-europäischen Populationen ist die C282Y-Variante weitaus seltener anzutreffen als in europäischen Bevölkerungen. Da diese Tatsache möglicherweise einen Störfaktor darstellt, wurden die statistischen Analysen nochmals an einer Untergruppe durchgeführt, die ausschließlich HCV-Patienten mit deutscher Abstammung umfasste. In dieser Untergruppe trat die C282Y-Variante signifikant häufiger auf als bei gesunden Kontrollen (HCV-deutsch: CY 11,1%, Kontrollen: 6,2%, $p=0,028$). Analyierte man den Einfluss der C282Y-Variante auf den Schweregrad der Erkrankung so konnte hier keine Assoziation festgestellt werden. Gegen die Hypothese, dass die C282Y-Variante für den Schweregrad der Erkrankung in HCV-Patienten eine wichtige Rolle spielt, spricht auch die Beobachtung, dass keine eindeutige Assoziation von Fibrosegrad und C282Y-Alteration nachgewiesen werden konnte. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass durch die Bildung einer weiteren Subgruppe die statistische Power herabgesetzt ist.

Auf der Basis der in dieser Studie zu Stande gekommenen Ergebnisse kann die Frage, ob ein Vorliegen der C282Y-Variante den Schweregrad der Lebererkrankung bei Patienten mit Hepatitis C-Virusinfektion beeinflusst, nicht eindeutig beantwortet werden. Insgesamt fallen die pathologischen Effekte der C282Y-Variante nicht so deutlich aus

wie in einigen anderen Studien. Einzig in der Gruppe der HCV-Patienten deutscher Abstammung konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Krankheitsentstehung nachgewiesen werden. Möglicherweise spielen in dieser Studie andere, nicht kontrollierte Faktoren eine stärkere Rolle als in Studien, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen C282Y-Variante und Schweregrad der Erkrankung gezeigt haben. Nicht erkannter erhöhter Alkoholkonsum beispielsweise könnte einen nicht unerheblichen Einflussfaktor darstellen und den Effekt der C282Y-Variante verschleiern. Darüber hinaus ist die Vergleichbarkeit einiger Studien diesbezüglich eingeschränkt. So wurde zum Beispiel in der Studie von Kazemi-Shirazi *et al.* ein erhöhter Alkoholkonsum zugelassen (Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999). Sicherlich kann die C282Y-Variante das Phänomen der Eisenüberladung bei HCV-Patienten nur partiell erklären. Denkbar wäre auch, dass das Virus direkt auf den Eisenstoffwechsel einwirkt oder erhöhte Eisenwerte Folge von Entzündung und Zelluntergang sind.

4.1.6 Patienten mit kryptogener Lebererkrankung

Bislang wurden *HFE*-Gen-Varianten bei der kryptogenen Lebererkrankung noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie wurden 67 Patienten mit kryptogener Lebererkrankung untersucht. Für diese Gruppe war eine Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante (14,9%) im Vergleich zu Kontrollen zu verzeichnen. Diese Assoziation war signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,046$). Insgesamt 55 Patienten in dieser Gruppe (82,1%) hatten sich einer LTX unterzogen. Vergleich man die *HFE*-Genotypverteilung von Patienten mit bzw. ohne LTX, so stellte sich keine statistisch signifikante Assoziation der heterozygoten C282Y-Variante in Patienten mit LTX heraus.

Das heterozygote Vorliegen einer C282Y-Variante könnte somit ein begünstigender Faktor für die Entwicklung einer kryptogenen Leberzirrhose sein; neben weiteren genetischen Alterationen und Umwelteinflüssen. Dabei könnte es sich auch z.B. um nicht untersuchte Genalterationen handeln, die mit der C282Y-Variante im Kopplungsungleichgewicht liegen (denkbar z.B. für den MHC). Ein Kopplungsungleichgewicht liegt vor, wenn zwei Allele an zwei benachbarten Genorten häufiger gemeinsam vererbt werden, als durch Zufall in einer Population zu erwarten

wäre. Dies ist der Fall, wenn die Genorte gemeinsam in einem sog. Haploblock vorliegen, der in der Regel nicht durch Crossing-over getrennt wird. So wurde beispielsweise für bestimmte HLA-Haplotypen ein erhöhtes Risiko für die Autoimmunhepatitis beobachtet (Czaja und Donaldson, 2002) und einige HLA-Gene scheinen auch mit einer Erkrankungsprogression bei PBL assoziiert zu sein (Donaldson *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit ist das gleichzeitige Vorliegen einer Genalteration im α_1 -Antitrypsin-Gen, was eine Kumulation profibrogener Reize bedeuten und damit eine Fibrosierung der Leber begünstigen könnte. Eine Überlegung ist auch, ob gleichzeitig eine Genalteration in einem weiteren Gen mit Bedeutung für den Eisenmetabolismus (Ferroportin, Transferrinrezeptor 2, Hepcidin) vorliegen könnte, so dass erst die Kombination aus beiden Alterationen zu einer Risikoerhöhung für die manifeste Erkrankung führt. Da ein pathologisch erhöhter serologischer Eisenstatus (Eisen, Ferritin, Tansferrin, Transferrinsättigung) der Patienten jedoch ausgeschlossen wurde, ist dieser Pathomechanismus unwahrscheinlich, wengleich der Lebereisengehalt letztlich unbekannt ist.

4.1.7 Patienten mit nichtalkoholischer Fettleberhepatitis

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, welche Faktoren bei der Entwicklung einer NASH eine Rolle spielen. Allerdings ist bekannt, dass die Erkrankung vornehmlich bei Patienten mit Adipositas, Typ-2-Diabetes mellitus und Hyperlipidämie auftritt. Day und James schlagen eine sog. „two-hit“-Theorie vor, der zu Folge eine Störung des Fettsäure- und Triglycerid-Metabolismus zu hepatischer Triglycerid-Akkumulation führt („first hit“), und ein variabler weiterer Faktor („second hit“) letztendlich zur Progression der NASH führt (Day und James, 1998). Möglicherweise stellt die *HFE*-Gen-assoziierte Eisenakkumulation mit sukzessiver Peroxidation von Fettsäuren einen dieser Faktoren dar. Eine milde Form der hepatischen Eisenakkumulation wurde in einigen Patienten mit NASH bereits beschrieben und eine Assoziation mit *HFE*-Gen-Alterationen ist in einigen kleinen Studien untersucht worden: In einer Studie mit 51 Patienten mit NASH war die Prävalenz der C282Y-Variante mit erhöhten Lebereisenwerten und Fibrosescores assoziiert (George *et al.*, 1998). In einer US-amerikanischen Studie untersuchten Bonkovsky *et al.* 57 Patienten mit NASH hinsichtlich ihres *HFE*-Gen-Status. Sie fanden, dass die *HFE*-Gen-Variante C282Y in diesen Patienten mit

vermehrter Fibrosierung assoziiert war. Außerdem wurden bei Patienten mit *HFE*-Gen-Variante erhöhte Lebereisenwerte beobachtet (Bonkovsky *et al.*, 1999). In einer Studie von Chitturi *et al.* mit 93 Patienten mit NASH wurde hingegen kein positiver Zusammenhang zwischen *HFE*-Gen-Alterationen und Leberfibrose gefunden. Dieser Studie zu Folge stellen *HFE*-Gen-Alterationen keine zusätzlichen Risikofaktoren für die Fibroseprogression in NASH dar (Chitturi *et al.*, 2002). Auch in einer Studie mit 272 italienischen Patienten mit NASH konnte keine signifikant erhöhte Prävalenz der *HFE*-Gen-Varianten bei Patienten im Vergleich mit Kontrollen gefunden werden (Neri *et al.*, 2007). In einer amerikanischen Studie wiederum mit 126 Teilnehmern mit NASH betrug die Prävalenz der heterozygoten C282Y-Variante 14,3%. Die Variante war in dieser Studie mit einem erhöhten Fibrosegrad assoziiert (Nelson *et al.*, 2007).

Insgesamt wurden in unserer Untergruppe der Patienten mit NASH 49 Patienten auf ihren *HFE*-Gen-Status untersucht. Es konnte keine erhöhte Prävalenz der C282Y- bzw. H63D-Variante in dieser Gruppe im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden. Über einen möglichen Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf den Schweregrad der Erkrankung konnte keine Aussage gemacht werden, da nur ein Patient mit Leberzirrhose bzw. LTX in dieser Gruppe vorlag.

Insgesamt deuten aber auch die diskrepanten Studienergebnisse anderer Forschungsgruppen auf keinen oder einen unbedeutenden Einfluss der *HFE*-Gen-Alterationen bei Patienten mit NASH hin. Dies wird mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt.

4.1.8 Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung

Zu einem Zusammenhang zwischen *HFE*-Gen-Alterationen und cholestatischen Lebererkrankungen liegen keine expliziten Studiendaten vor. Höhler *et al.* stellte in einer Studie eine Überrepräsentanz der C282Y-Variante in einer Gruppe mit Patienten mit Autoimmunhepatitis und primär biliärer Zirrhose fest (Höhler *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie wurden 217 Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen auf ihren *HFE*-Gen-Status hin untersucht. Der Anteil an heterozygoten Trägern der C282Y-Variante betrug hier 5,5%, der der H63D-Variante 22,6%, was etwa der Verteilung im Kontrollkollektiv entsprach. Analyierte man den Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf

den Schweregrad der Erkrankung in dem man die Genotypverteilung zwischen Patienten mit Zirrhose (bzw. LTX) und Patienten ohne Zirrhose (bzw. LTX) miteinander verglich, so konnte auch hier keine Assoziation festgestellt werden.

4.2 Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten auf die Entwicklung eines HCC

Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss *HFE*-Gen-Alterationen im Sinne eines Risikofaktors auf die Entwicklung eines HCC haben. Molekulare Konsequenz einer Eisenüberladung der Zelle ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche wiederum zu oxidativer Schädigung genomischer DNA führen (Loeb *et al.*, 1988). Molekulargenetische Untersuchungen an nicht-tumorösem Lebermaterial von Patienten mit Hämochromatose ergaben, dass die Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen durch eine Eisenüberladung gehäuft zu Mutationen im Codon 249 des Tumorsuppressorgens p53 führen (Hussain *et al.*, 2000). Eine hepatische Eisenakkumulation trägt unabhängig von der Grunderkrankung zu der Entwicklung eines HCC bei (Turlin *et al.*, 1995). Studien, die die Bedeutung der *HFE*-Gen-Alterationen für das HCC untersuchten, ergaben diskrepante Ergebnisse (Tabelle 20).

Tabelle 20: Studienergebnisse zur Bedeutung der C282Y-Variante im Vergleich

Studie/Land	Anzahl	Häufigkeit des heterozygoten C282Y-Genotyps			Assoziation*
		HCC	non-HCC	Kontrollen	
(Hellerbrand <i>et al.</i> , 2003)/Deutschland	137	12,4%	3,7%	4,8%	ja
(Fargion <i>et al.</i> , 2001)/Italien	81	8,6%		1,6%	ja
(Boige <i>et al.</i> , 2003)/Frankreich	133	5,0%	4,0%		nein
(Cauza <i>et al.</i> , 2003)/Österreich	162				nein, Allelfrequenz (C282Y/H53D): 8,3%

*Assoziation der heterozygoten C282Y-Variante und HCC

Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind nicht immer unmittelbar miteinander vergleichbar. Fargion *et al.* beispielsweise verglichen das Patientenkollektiv der HCC-

Patienten ausschließlich mit gesunden Kontrollen, eine Kontrollgruppe mit Patienten mit Leberzirrhose ohne HCC fehlte. Idealerweise sollte jedoch auch eine Kontrollgruppe herangezogen werden, die sich ausschließlich im untersuchten Merkmal von der Studienpopulation unterscheidet. Darüber hinaus war die Studien-Populationen mit 81 HCC-Patienten relativ klein, was weiterhin die Aussagekraft dieser Untersuchung schmälert. Des Weiteren wurden die Studien in Populationen unterschiedlicher Ethnizität durchgeführt, die sich teilweise deutlich in der C282Y-Genotypverteilung voneinander unterscheiden.

In der vorliegenden Studie wurde bei 109 Patienten der 1557 in die Studie eingeschlossenen Patienten die Diagnose eines HCC gestellt. Bei 107 dieser Patienten entwickelte sich das HCC auf dem Boden einer zirrhotisch vorgeschädigten Leber. Die Verteilung der heterozygoten C282Y-Variante unterschied sich nicht signifikant, wenn Patienten mit Leberzirrhose und HCC mit Patienten mit alleiniger Leberzirrhose verglichen wurden (HCC+Zirrhose: CY 10,1%, nur Zirrhose: CY 8,4%; exakter Fisher-Test: $p=0,58$). Selbst wenn als Vergleichsgruppe gesunde Kontrollen zu Grunde gelegt wurden, unterschied sich die Verteilung der C282Y-Variante nicht signifikant voneinander (exakter Fisher-Test, $p=0,31$).

Auch für die Verteilung H63D-Variante wurde, im Einklang mit der vorbeschriebenen untergeordneten Rolle der H63D-Variante, bei keiner dieser Analysen eine Überrepräsentanz dieser Genalteration beobachtet.

Um einen möglichen Einfluss der *HFE*-Gen-Varianten in Hinblick auf die Grunderkrankung zu untersuchen wurden die Analysen auf die größeren Untergruppen heruntergebrochen. Lauret *et al.* untersuchten in einer kleinen spanischen Studie die Assoziation zwischen den *HFE*-Gen-Alterationen und dem Auftreten eines HCC unter 277 Patienten mit Leberzirrhose (davon 77 mit HCC). Sie fanden eine erhöhte Prävalenz der C282Y-Heterozygotie (20,9%) bei Patienten mit HCC auf dem Boden einer alkoholtoxischen Leberzirrhose ($n=42$) und schlussfolgerten, dass diese Variante mit einem erhöhten Risiko eines HCC in Patienten mit alkoholtoxischer Leberzirrhose einhergeht (Lauret *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Studie befanden sich in der Untergruppe der Patienten mit

alkoholtoxischer Lebererkrankung insgesamt 233 Patienten, von denen 29 Patienten ein HCC entwickelt hatten (12,4%). In dieser Untergruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der C282Y- und der H63D-Variante zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden. In Hinblick auf die relativ kleine Anzahl an HCC-Fällen von nur 29 Patienten steht die Aussagekraft dieser Studie hinter den Studien von Lauret *et al.* mit einer höheren statistischen Power zurück. In der Untergruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion waren insgesamt 687 Patienten von denen 53 Patienten (7,7%) ein HCC entwickelt hatten. Es konnte zwar eine Überrepräsentanz der C282Y-Variante in Patienten mit HCC im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden (Kontrollen: CY 6,2%, HCC: CY 15,1%) diese war jedoch nicht signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,08$). Insgesamt lassen diese Ergebnisse keine Rückschlüsse auf einen Effekt der C282Y-Variante auf die Entwicklung eines HCC bei HCV-bedingter Lebererkrankung zu.

In der Zusammenschau der auf der Basis dieser Studie gewonnenen Resultate mit den in der Literatur vorbeschriebenen Ergebnissen gibt es keinen Hinweis auf bedeutsame Effekte der *HFE*-Gen-Varianten auf die Entwicklung eines HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose bzw. bei Vorliegen einer Hepathopathie. Möglicherweise ist ein zur Kanzerogenese beitragender Effekt zu schwach und kann daher durch andere Einflussfaktoren leicht verschleiert werden. Um einen womöglich schwachen genetischen Effekt nachweisen zu können, müssten größere Patientenkollektive rekrutiert werden.

4.3 Problematik genetischer Studien

4.3.1 Haplotypen

Durch die Analyse einer einzelnen Genvariante kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere, nicht untersuchte Genalterationen, die mit ersterer im „linkage disequilibrium“ (Kopplungsungleichgewicht) liegen, krankheitsrelevant sind. Ein Kopplungsungleichgewicht liegt vor, wenn zwei Allele an zwei benachbarten Genorten häufiger gemeinsam vererbt werden, als durch Zufall in einer Population zu erwarten

wäre. Befinden sich weitere Genalterationen in der regulatorischen Region des jeweiligen Gens ist es wahrscheinlich, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. Aus diesem Grund scheinen die Bestimmung mehrerer Genvarianten eines Gens und die Rekonstruktion der Haplotypen angezeigt. Die Haplotypenanalyse berücksichtigt Gen-Gen-Zusammenspiele in einer Region und verbessert die Aussagekraft über mögliche Interaktionen oder deckt sie erst auf.

4.3.2 Umweltfaktoren

Neben Alkoholkonsum und Hepatitisinfektionen existieren viele weitere Umweltfaktoren, die nicht, oder nur schwer erfassbar sind. Kontakt mit weiteren hepatotropen Infektionserregern, Tabakrauch, hepatotoxische Medikamente und Industriegifte, Pilzgifte, Ernährung und andere gehören dazu. Es sind auch einige nicht *HFE*-Gen-assoziierte Erkrankungen des Eisenstoffwechsels bekannt. Dazu gehört das so genannte „African overload“, das eine erhöhte Eisenakkumulation bei Personen darstellt, die einen Konsum von speziellem, nichtkommerziell hergestelltem Bier aufweisen. Dieses Bier wird in Eisenfässern gebraut und hat ein extrem hohes Eisengehalt. Diese Faktoren können auch regional unterschiedlich gewichtet sein, so dass die Vergleichbarkeit von Populationen vermindert bzw. eine schwacher genetischer Effekt vollständig kaschiert werden kann.

4.3.3 Ethnizität

Die Allel-Frequenz der C282Y-Variante hat eine starke geographische Variation, so ist in Europa ist ein starkes Nord-Süd-Gefälle zu beobachten. In Afrika und Asien spielt die C282Y-Variante eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Prävalenz. In solchen Regionen können Erkrankungen wie beispielsweise die β -Thalässämie einen großen Einfluss auf den Eisenstoffwechsel haben und milde genetische Effekte der *HFE*-Gen-Alterationen möglicherweise verschleiern. Auch die regional unterschiedliche Gewichtung von Umweltfaktoren kann im Zusammenhang mit dem jeweils vorgefundenen genetischen Risikoprofils die unterschiedliche Bedeutung der *HFE*-Gen-Varianten erklären. Daher sollte die Studienpopulation hinsichtlich der ethnischen Abstammung möglichst homogen sein, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch populationsspezifische Faktoren zu vermeiden. Gleiches gilt für die ausgewählte

Kontrollpopulation.

4.3.4 Vergleichbarkeit von Studien

HFE-Gen-Varianten wurde in einigen unterschiedlichen Studien als genetische Risikofaktoren für Leberzirrhose und das HCC beschrieben und analysiert. Dennoch ist die Vergleichbarkeit der Studien zum Teil stark eingeschränkt, wenn die Grunderkrankung nicht genau beschrieben wurde bzw. die jeweiligen Diagnosekriterien von Studie zu Studie differieren. Ein methodeninhärentes Problem von Studien, die an Universitätskliniken durchgeführt wurden, ist die Tatsache, dass die Patienten unter Umständen ein fortgeschritteneres Krankheitsbild präsentieren und damit ein selektioniertes Patientengut darstellen. Bei der Auswertung von Studienergebnissen wurden teilweise unterschiedlich zusammengestellte Untergruppen miteinander verglichen bzw. unterschiedliche statistische Verfahren verwendet was die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse weiterhin erschwert. Zusätzlich mag in der Literatur auch zusätzlich die Tendenz eine Rolle spielen positive Ergebnisse bevorzugt zu veröffentlichen, so dass Negativergebnisse keine Erwähnung finden.

4.4 Schlussfolgerung

Unter Berücksichtigung aller genannten Ergebnisse dieser Untersuchung kann die zentrale Frage nach der Bedeutung der *HFE*-Gen-Varianten bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen verschiedener Ätiologie folgendermaßen beantwortet werden:

- Die Prävalenz der heterozygoten C282Y-Variante war in Patienten mit kryptogener Lebererkrankung signifikant erhöht, was möglicherweise ein Zeichen für den Einfluss dieser *HFE*-Gen-Variante auf die Erkrankung ist. Auch Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion deutscher Abstammung wiesen eine erhöhte Prävalenz der C282Y-Variante auf.
- Ein Einfluss der C282Y- bzw. H63D-Variante auf den Schweregrad der Erkrankung im Sinne einer höhergradigen Fibrose, dem Auftreten einer

Zirrhose oder der Indikation zur LTX konnte in den einzelnen Gruppen nicht gefunden werden.

- Auch ein Einfluss der C282Y- bzw. H63D-Variante auf die Entstehung eines HCC konnte nicht bestätigt werden.

Insgesamt lässt sich daher sagen, dass Patienten mit heterozygoter C282Y-Variante ein höheres Risiko haben, eine kryptogene Lebererkrankung zu entwickeln. Sicherlich kann die kryptogene Lebererkrankung nur partiell durch den genetischen Einfluss der C282Y-Variante erklärt werden. In der Krankheitsätiologie spielen andere, unbekanntere genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle. Dabei könnte es sich z.B. um bisher nicht untersuchte Genalterationen handeln, die mit der C282Y-Variante im Kopplungsungleichgewicht liegen (z.B. HLA-Gene). Eine weitere Möglichkeit ist das gleichzeitige Vorliegen einer Genalteration im α_1 -Antitrypsin-Gen welche eine Kumulation profibrogener Reize bedeuten und damit eine Fibrosierung der Leber begünstigen könnte.

Bezüglich der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion muss in der Zusammenschau mit den in der Literatur beschriebenen diskrepanten Ergebnissen ein eindeutiger pathologischer Effekt der C282Y-Variante hinsichtlich Schweregrad der Erkrankung in Frage gestellt werden. Einzig in der Gruppe der HCV-Patienten deutscher Abstammung konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Krankheitsentstehung nachgewiesen werden. Es kann allenfalls ein schwacher Effekt konstatiert werden, der durch andere Einflussfaktoren möglicherweise leicht verschleiert wird. Die regional unterschiedliche Gewichtung ätiologischer Faktoren (Genotyp des Hepatitisvirus, Alkoholkonsum, hepatotoxische Industriegifte, Aflatoxin B1 u. a.) im Zusammenhang mit der jeweils vorgefundenen Genotypverteilung (im Sinne eines Risikoprofils der jeweiligen ethnischen Gruppe) kann zumindest teilweise die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der *HFE*-Gen-Varianten als Risikofaktoren für Leberzirrhose in HCV-Patienten erklären. Die in der Literatur beschriebene Eisenüberladung bei HCV-Patienten kann durch das Vorliegen einer C282Y-Variante nicht vollständig erklärt werden. Denkbar wäre auch, dass das Virus direkt auf den Eisenstoffwechsel einwirkt oder erhöhte Eisenwerte Folge von Entzündung und Zelluntergang sind. Der genaue Mechanismus der vermehrten Eisenüberladung bei Patienten mit chronischer Hepatitis

C-Virusinfektion bleibt weiterhin unklar.

In der Zusammenschau der auf der Basis dieser Studie gewonnenen Resultate mit den in der Literatur vorbeschriebenen diskrepanten Ergebnissen gibt es auch keinen Hinweis auf einen bedeutsamen Effekt der *HFE*-Gen-Varianten auf die Entwicklung eines HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose bzw. bei Vorliegen einer Hepathopathie. Diese Patienten haben bei Vorliegen einer *HFE*-Gen-Alteration kein erhöhtes Risiko ein HCC zu entwickeln. Möglicherweise ist ein zur Kanzerogenese beitragender Effekt zu schwach.

Um dennoch einen schwachen Effekt der *HFE*-Gen-Alterationen eindeutig nachweisen zu können, müssten in Zukunft deutlich größere Assoziationsstudien mit mehreren tausend Teilnehmern durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Möglicherweise moduliert die hepatische Eiseneinlagerung in Folge von Alterationen im *HFE*-Gen die Progression einer gleichzeitig vorliegenden chronischen Lebererkrankung. Bisher wird kontrovers beurteilt, ob Variationen im *HFE*-Gen als profibrogene Stimuli den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen können. Darüber hinaus kann ein karzinogener Effekt durch Eisenakkumulation auch für die Entwicklung des HCC eine Rolle spielen. In der vorliegenden Dissertation wurde die Hypothese untersucht, ob die *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D die Entwicklung und Progression chronischer Lebererkrankungen und die Entwicklung eines HCC im Sinne genetischer Risikofaktoren negativ beeinflussen. Im Rahmen von Subgruppenanalysen sollten Grunderkrankungen benannt werden, die bei Vorliegen einer *HFE*-Gen-Alteration ein besonders hohes Risiko für Erkrankungsprogression oder HCC haben.

Es wurden insgesamt 1557 Patienten, die im Zeitraum von 1988 bis 2003 wegen chronischer Lebererkrankungen behandelt worden sind, und 355 gesunde Kontrollpersonen in die Studie eingeschlossen. Die Detektion der *HFE*-Gen-Varianten C282Y und H63D wurde mittels PCR-Amplifikation und nachfolgender Schmelzkurvenanalyse mit „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET)-Proben im LightCycler-Gerät durchgeführt. An Hand klinischer, laborchemischer, bildmorphologischer und histologischer Befunde wurden nach definierten Kriterien folgende Diagnosegruppen gebildet: Patienten mit Autoimmunhepatitis (AIH, n=103), Patienten mit alkoholtoxischer Lebererkrankung (ALD, n=233), Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virusinfektion (HBV, n=201), Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (HCV, n=687), Patienten mit kryptogener Lebererkrankung (CLD, n=67), und Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleberhepatitis (NASH, n=49). Patienten mit primär biliärer Zirrhose sowie Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) wurden in die Gruppe der Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung (PBC/PSC, n=217) zusammengefasst. Patienten deutscher Abstammung mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion wurden zusätzlich gesondert betrachtet (HCV-deutsch, n= 558). Bei 1150 Patienten (73,9% des Gesamtkollektivs) konnte eine Fibrosegrad-Bestimmung nach Scheuer durchgeführt werden. Für 857

Patienten (55,5% des Gesamtkollektivs) wurde klinisch oder histologisch die Diagnose einer Leberzirrhose gestellt. Insgesamt 681 Patienten (43,7% des Gesamtkollektivs) hatten eine Lebertransplantation in Folge dekompenzierter Leberzirrhose erhalten. Für 109 Patienten (7% der Gesamtkollektivs) wurde die Diagnose eines HCC festgestellt.

Für die Patienten mit kryptogener Lebererkrankung und HCV-Infektion deutscher Abstammung konnte eine Überrepräsentanz der heterozygoten C282Y-Variante im Vergleich zu Kontrollen verzeichnet werden (CLD: CY 14,9%, HCV-deutsch: CY 9,9%, Kontrollen: CY 6,2%). Diese Assoziationen waren signifikant (exakter Fisher-Test, $p=0,046$ bzw. $p=0,013$). Für alle anderen Patientengruppen war ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der C282Y-Variante im Vergleich mit Kontrollen nicht nachweisbar ($p>0,05$). Für die Verteilung H63D-Variante wurden keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen gefunden. In keiner Diagnosegruppe waren *HFE*-Gen-Alterationen mit höhergradiger Fibrose, Leberzirrhose oder der Indikation zur Lebertransplantation assoziiert. Die Verteilung des *HFE*-Genotyps und insbesondere die Häufigkeit der heterozygoten C282Y-Variante unterschied sich nicht zwischen Patienten mit HCC und Patienten mit alleiniger Leberzirrhose bzw. gesunden Kontrollen (HCC: CY 10,1%, Zirrhose: CY 8,4%, Kontrollen: CY 6,2%).

Patienten mit heterozygoter C282Y-Variante haben möglicherweise ein höheres Risiko, eine kryptogene Lebererkrankung zu entwickeln. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um weitere unbekannte genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse und den genauen Pathomechanismus der Erkrankung nachzuweisen. Bezüglich der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion muss in der Zusammenschau mit den in der Literatur beschriebenen diskrepanten Ergebnissen ein eindeutiger pathologischer Effekt der C282Y-Variante in Frage gestellt werden. Alterationen im *HFE*-Gen haben keinen Einfluss auf die Progression einer chronischen Lebererkrankung oder auf die Entstehung eines HCC im Sinne eines genetischen Risikofaktors.

6 Literatur

Ameis D. Ansätze zur Genterapie des hepatozellulären Karzinoms (HCC). Internist (Berl) 2000;41:208-212.

Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. Gastroenterology 1999;116:193-207.

Ballhausen WG. Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms - Stand 2003. Chirurgische Gastroenterologie 2003;19:207-213.

Barton JC, Harmon L, Rivers C, Acton RT. Hemochromatosis: association of severity of iron overload with genetic markers. Blood Cells Mol Dis 1996;22:195-204.

Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. Hepatology 1986;6:24-29.

Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. Hepatology 2003;37:493-503.

Beinker NK, Voigt MD, Arendse M *et al.* Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. J Hepatol 1996;25:633-638.

Berg T, Neuhaus R, Klein R *et al.* Distinct enzyme profiles in patients with cryptogenic cirrhosis reflect heterogeneous causes with different outcomes after liver transplantation (OLT): a long-term documentation before and after OLT. Transplantation 2002;74:792-798.

Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. Ann Intern Med 2000;133:329-337.

Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Waalen J. Haematological effects of the C282Y HFE mutation in homozygous and heterozygous states among subjects of northern and southern European ancestry. Br J Haematol 2003;120:887-893.

Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. Lancet 2002;359:211-218.

Boige V, Castera L, de Roux N *et al.* Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut* 2003;52:1178-1181.

Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:421-429.

Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K *et al.* Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2002;37:848-854.

Britton RS und Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* 1994;41:343-348.

Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996;335:1799-1805.

Caselmann WH, Spengler U, Fischer HP, Sauerbruch T. Leberzirrhosen als Präkanzerosen. *Internist (Berl)* 1997;38:928-936.

Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H *et al.* Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:442-447.

Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S294-S308.

Chitturi S, Weltman M, Farrell GC *et al.* HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology* 2002;36:142-149.

Czaja AJ und Donaldson PT. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2051-2057.

Day CP und James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.

Distante S, Bjoro K, Hellum KB *et al.* Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver*

2002;22:269-275.

Dominguez-Malagon H und Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol* 2001;25:497-516.

Donaldson P, Agarwal K, Craggs A *et al.* HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. *Gut* 2001;48:397-402.

Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998;75:347-354.

Durr R und Caselmann WH. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:154-161.

Enns CA. Pumping iron: the strange partnership of the hemochromatosis protein, a class I MHC homolog, with the transferrin receptor. *Traffic* 2001;2:167-174.

Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C *et al.* HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:335-342.

Erhardt A, Theobald I, Petry W *et al.* [Hepatocellular carcinoma: rising incidence of hepatitis C virus-associated cases at a university clinic in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:2665-2668.

Fargion S, Stazi MA, Fracanzani AL *et al.* Mutations in the HFE gene and their interaction with exogenous risk factors in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:505-511.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-S50.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.

Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A *et al.* The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997;272:14025-14028.

- Fracanzani AL, Fargion S, Stazi MA *et al.* Association between heterozygosity for HFE gene mutations and hepatitis viruses in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:27-32.
- Ganne-Carrie N, Christidis C, Chastang C *et al.* Liver iron is predictive of death in alcoholic cirrhosis: a multivariate study of 229 consecutive patients with alcoholic and/or hepatitis C virus cirrhosis: a prospective follow up study. *Gut* 2000;46:277-282.
- Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I *et al.* Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med* 2003;81:780-787.
- Geier A, Reugels M, Weiskirchen R *et al.* Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2004;24:285-294.
- George DK, Goldwurm S, MacDonald GA *et al.* Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-318.
- Ghaziani T, Alavian SM, Zali MR *et al.* Serum measures of iron status and HFE gene mutations in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2007;37:172-178.
- Grove J, Daly AK, Burt AD *et al.* Heterozygotes for HFE mutations have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 1998;43:262-266.
- Hellerbrand C, Poppl A, Hartmann A, Scholmerich J, Lock G. HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:279-284.
- Hezode C, Cazeneuve C, Coue O *et al.* Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol* 1999;31:979-984.
- Höhler T, Leininger S, Köhler HH, Schirmacher P, Galle PR. Heterozygosity for the hemochromatosis gene in liver diseases--prevalence and effects on liver histology. *Liver* 2000;20:482-486.
- Hussain SP, Raja K, Amstad PA *et al.* Increased p53 mutation load in nontumorous

human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:12770-12775.

Institut für Therapieforschung. Alkoholprävalenzen. 2006.
(<http://www.ift.de/index.php?id=220&0=>)

Kakizaki S, Takagi H, Horiguchi N *et al.* Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. Liver 2000;20:125-128.

Kasai Y, Takeda S, Takagi H. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: a review from the viewpoint of molecular analysis. Semin Surg Oncol 1996;12:155-159.

Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T *et al.* The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 1999;116:127-134.

Kim YJ, Lee HS, Im JP *et al.* Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. Exp Mol Med 2003;35:196-202.

Lauret E, Rodriguez M, Gonzalez S *et al.* HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol 2002;97:1016-1021.

Lee HS, Yoon JH, Kamimura S *et al.* Lack of association of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms with the risk of human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 1997;71:737-740.

Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations. Liver Int 2004;24:631-636.

Loeb LA, James EA, Waltersdorph AM, Klebanoff SJ. Mutagenesis by the autoxidation of iron with isolated DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:3918-3922.

Lucotte G und Dieterlen F. A European allele map of the C282Y mutation of hemochromatosis: Celtic versus Viking origin of the mutation? Blood Cells Mol Dis 2003;31:262-267.

Lyon E und Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. Clin Chem 2001;47:1147-1156.

- Maeda H und Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:854-865.
- Martinelli AL, Filho AB, Franco RF *et al.* Liver iron deposits in hepatitis B patients: association with severity of liver disease but not with hemochromatosis gene mutations. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1036-1041.
- Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG *et al.* Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol* 2000;102:152-156.
- McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED *et al.* Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2384-2387.
- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJ. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test* 2000;4:183-198.
- Milman N und Pedersen P. Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin Genet* 2003;64:36-47.
- Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L *et al.* Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:13-20.
- Mura C, Raguénes O, Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502-2505.
- Negro F, Samii K, Rubbia-Brandt L *et al.* Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J Med Virol* 2000;60:21-27.
- Nelson JE, Bhattacharya R, Lindor KD *et al.* HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;46:723-729.
- Németh E, Tuttle MS, Powelson J *et al.* Hfeclonin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-2093.
- Neri S, Pulvirenti D, Santo S *et al.* The HFE gene heterozygosity H63D: a cofactor for

liver damage in patients with steatohepatitis? Epidemiological and clinical considerations. *Intern Med J* 2007;101:1601-8.

Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;350:2383-2397.

Piperno A, Vergani A, Malosio I *et al.* Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 1998;28:1105-1109.

Pirisi M, Scott CA, Avellini C *et al.* Iron deposition and progression of disease in chronic hepatitis C. Role of interface hepatitis, portal inflammation, and HFE missense mutations. *Am J Clin Pathol* 2000;113:546-554.

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.

Ramm GA, Crawford DH, Powell LW *et al.* Hepatic stellate cell activation in genetic haemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol* 1997;26:584-592.

Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986.

Risch N. The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:733-741.

Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin Nr.46. 2006.

(http://www.rki.de/cln_048/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/46__06,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/46_06.pdf)

Robinson WS. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu Rev Med* 1994;45:297-323.

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

Shin HD, Park BL, Kim LH *et al.* Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet* 2003;12:901-906.

Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976;17:332-334.

Smith BC, Gorge J, Guzail MA *et al.* Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;27:1695-1699.

Sterneck M. Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms. *Internist (Berl)* 2000;41:185-190.

Suriawinata A und Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:77-88.

Sutton A, Nahon P, Pessayre D *et al.* Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic iron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-induced cirrhosis. *Cancer Res* 2006;66:2844-2852.

Thorburn D, Curry G, Spooner R *et al.* The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut* 2002;50:248-252.

Tung BY, Emond MJ, Bronner MP *et al.* Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003;124:318-326.

Turlin B, Juguet F, Moirand R *et al.* Increased liver iron stores in patients with hepatocellular carcinoma developed on a noncirrhotic liver. *Hepatology* 1995;22:446-450.

Valenti L, Pulixi EA, Arosio P *et al.* Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica* 2007;92:1037-1042.

Vogel A, Kneip S, Barut A *et al.* Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene. *Gastroenterology* 2001;121:1136-1144.

Wallace DF, Dooley JS, Walker AP. A novel mutation of HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology* 1999;116:1409-1412.

Wasmuth HE, Lammert F, Matern S. Genetische Risikofaktoren der Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen. *Med Klin (München)* 2003;98:754-762.

- Willis G, Bardsley V, Fellows IW *et al.* Hepatocellular carcinoma and the penetrance of HFE C282Y mutations: a cross sectional study. *BMC Gastroenterol* 2005;5:17.
- Worwood M. Inherited iron loading: genetic testing in diagnosis and management. *Blood Rev* 2005;19:69-88.
- Yamauchi M, Nakahara M, Maezawa Y *et al.* Prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis and prior exposure to hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993;88:39-43.
- Yano M, Hayashi H, Wakusawa S *et al.* Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002;97:133-137.
- Yu MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S *et al.* Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;109:1266-1273.
- Yu MW, Yang SY, Chiu YH *et al.* A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999;29:697-702.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Neuhaus und Herrn Prof. Dr. Wiedenmann für die Rahmenbedingungen, die diese Promotion ermöglichten, danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Gero Puhl, möchte ich für Vergabe des Dissertationsthemas danken.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Heiko Witt, der mich bei inhaltlichen Fragen kompetent beriet und freundlich unterstützte.

Ganz besonders erwähnen und danken möchte ich Herrn Dr. Gereon Gäbelein und Frau Dr. Juliane Halangk an, die mich mit Kompetenz und Freundlichkeit in allen Phasen der Dissertation geduldig betreut und motiviert haben.

Frau Claudia Güldner danke ich für die angenehme Einarbeitung und stets fröhliche Zusammenarbeit im Labor.

Meiner Partnerin, Frau Dr. Daniela Blaschke, möchte ich vor allem für ihre liebevolle Unterstützung und Geduld während des schriftlichen Teils der Arbeit danken.

Besonders meinen lieben Eltern und meinen Geschwistern sei für ihre kontinuierliche und liebevolle Unterstützung Dank ausgesprochen. Meine Eltern förderten mich während meines Studiums und haben mir damit diese Arbeit erst ermöglicht.

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

9 Erklärung

„Ich, Richard Waluga, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Der Einfluss der Hämochromatose (HFE)-Gen-Varianten auf die Progression chronischer Lebererkrankungen und die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort/Datum

Unterschrift