Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Polymorphismen des Mannose-Binding-Lectin (MBL 2) auf die Entwicklung und Progression von chronischen Lebererkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

> von Anna Hachfeld aus Hamburg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Th. Berg
- 2. Prof. Dr. F. Lammert
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Pirlich

Datum der Promotion: 13.02.2009

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ADH Antidiuretisches Hormon

AGT Angiotensinogen

ALDH Aldehydehydrogenase

APRI Aspartate-Aminotransferase-to-Platelet-Ratio-Index

AIH Autoimmune Hepatitis

Anc Anchor, Anker = Akzeptor

ALV Akutes Leberversagen

ApoE Apolipoprotein E

cDNA Complementary DNA

CTLA-4 Cytotoxic T-Lymophocyte-Antigen-4

Cyp2E1 Cytochrom P 2E1

Cyp4A Cytochrom P 4A

E Erwartungswert

FL Fluoreszin, Sensor

FRET Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer

HBV Hepatitis-B-Virus

HCC Hepatozelluläres Karzinom

HCV Hepatitis-C-Virus

IL Interleukin

LC Light-Cycler-Red, Anchor

LPS Lipopolysaccharide

LTX Lebertransplantation

m männlich

MASP MBL-activating-Serum-Protease

MBL Mannose-binding-Lectin

MBP Mannose-binding-Protein

MCP-1 Monocyte Chemotactic-Protein-1

NAFLD Nonalcoholic-Fatty-Liver-Disease

PBC Primär Biliäre Cirrhose

ph Phosphat

PSC Primär Sklerosierende Cholangitis

ROS Reactive-Oxigen-Species, reaktive Sauerstoffmoleküle

SE Standardabweichung

Sen Sensor = Donor

SLE Systemischer Lupus Erythematosus

SNP Single Nucleotid Polymorphism

TA Transaminasen

TGFß-1 Transformierender Wachstumsfaktor Beta 1

TNF-α Tumor-Nekrosefaktor-Alpha

5' UTR 5' untranslatierte Region

w weiblich

Inhaltsverzeichnis

1	EII	NLEITUNG	9
1.1	Ge	enetische Polymorphismen und Leberfibrose	9
	1.1.1	Entschlüsselung des Genoms und Kandidatengene	9
	1.1.2	Klinische Bedeutung des Wissens um Krankheitsassoziationer	ı12
	1.1.3	Entstehung von Leberfibrose	12
1.2	Da	s Mannose-Binding-Lectin (MBL) und genetische Variabilitä	t im MBL
	Ge	en	17
	1.2.1	Das Mannose-Binding-Lectin	17
	1.2.2	Genetische Varianten des MBL	18
	1.2.3	Epidemiologie	22
	1.2.4	Rolle in der Immunantwort	24
1.3	M	BL-Polymorphismen und Erkrankungen	27
1.4	M	BL-Polymorphismen und Lebererkrankungen	28
	1.4.1	MBL-Polymorphismen und Hepatitis B	28
	1.4.2	MBL-Polymorphismen und Hepatitis C	29
	1.4.3	MBL-Polymorphismen und Autoimmunerkrankungen	30
2	FF	RAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
3	PA	ATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Po	pulation	32
	3.1.1	Patienten	32
	3.1.2	Kontrollgruppe	37
	3.1.3	Erfassung klinischer Daten	37
3.2	Ma	aterial	40
	3.2.1	Geräte	40
	3.2.2	Verbrauchsmaterialien	41

	3.2.3	Reagenzien und Chemikalien	. 42
	3.2.4	Enzyme und zugehörige Puffer	. 42
	3.2.5	Primer und Sonden	. 43
	3.2.6	Software	. 43
3.3	Met	hoden	. 43
	3.3.1	Blutgewinnung und DNA Extraktion	. 43
	3.3.2	PCR	. 44
	3.3.3	Mutationsdetektion mittels Light-Cycler	. 45
	3.3.4	Statistische Methoden	. 52
4	ERO	GEBNISSE	53
4.1	Alle	Ifrequenzen und Genotypen	. 53
	4.1.1	Allelfrequenzen der MBL-Varianten	. 53
	4.1.2	Allelfrequenzen der MBL-Varianten bei unterschiedlichen Ethnien	. 56
	4.1.3	Genotypfrequenzen	. 58
	4.1.4	Haplotypenanalyse	. 61
4.2	Bed	eutung des MBL-Genotyps für die Schwere der Lebererkankung b	ei
	Pati	enten mit chronischer Hepatitis C	. 62
	4.2.1	MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom Fibrosestadium bei	
		Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion	. 62
	4.2.2	Haplotypenanalyse in Abhängigkeit vom Fibrosestadium bei Patiente	n
		mit chronischer Hepatitis C	. 65
	4.2.3	MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom nicht-invasiven	
		Fibrosescore APRI	. 65
	4.2.4	MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit histologisch gesicherter	
		Lebercirrhose	. 67
	4.2.5	Haplotypenanalyse bei Patienten mit histologisch gesicherter	
		Lebercirrhose	. 68
	4.2.6	MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit Lebercirrhose mit Hilfe d	les
		nicht-invasiven APRI-Scores	. 68
	4.2.7	MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit Lebertransplantation	. 70

4.3	The	rapieansprechen bei Patienten mit Hepatitis C	72
	4.3.1	MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom Therapieanspreche	en bei
		chronischer Hepatitis C	72
	4.3.2	Haplotypenanalyse in Abhängigkeit vom Therapieansprechen bei	
		chronischer Hepatitis C	74
5	DIS	KUSSION	77
5.1	Alle	elfrequenzen, Genotypen und Haplotypen	77
5.2	Sch	weregrad bei Patienten mit chronischer Hepatitis C	. 79
5.3	The	rapieansprechen bei Patienten mit Hepatitis C	82
5.4	Bese	ondere Aspekte einzelner Lebererkrankungen	83
5.5	Pro	blematik genetischer Studien, methodische Aspekte	84
	5.5.1	Grundsätzliche Aspekte	84
	5.5.2	Gen-Gen-Interaktionen und Haplotypenanalyse	85
	5.5.3	Methodik und Statistik	86
5.6	Klir	nische Relevanz und Ausblick	87
6	ZUS	SAMMENFASSUNG	88

1 Einleitung

1.1 Genetische Polymorphismen und Leberfibrose

1.1.1 Entschlüsselung des Genoms und Kandidatengene

Im Rahmen des Human-Genom-Projekts wurde die gesamte menschliche Erbinformation sequenziert und etwa 33000 Genen zugeordnet. Auch wenn die genaue biologische Funktion vieler dieser Gene noch unbekannt ist, können diese nun bekannten Sequenzinformationen für die Erforschung von Krankheitsursachen genutzt werden. Ist uns die biologische Funktion eines Proteins, für das ein bestimmtes Gen kodiert, bekannt, so ist es trotzdem oftmals schwierig vom Gen auf den Pathomechanismus einer Erkrankung zu schließen [1]. Für das Verständnis der Kausalzusammenhänge und der Wechselwirkungen von genetischen, epigenetischen und Umwelteinflüssen in der Krankheitsentstehung sind diese Informationen jedoch unerlässlich. Dass die Erkenntnisse, die man sich aus der Erforschung der Geneinflüsse verspricht, vor allem den Bereich der Krankheitsentstehung und des Verlaufs betreffen, stellt eine Herausforderung dar, mit diesem Wissen Vorsorge- und Behandlungsstrategien zu entwickeln, die tiefer greifen, als die Behandlung der Symptome.

Die meisten genetisch bedingten Erkrankungen folgen einem polygenen Vererbungsmuster und lassen sich daher nicht mit den klassischen Mendel'schen Gesetzen für monogene Erkrankungen beschreiben. Der größte Teil der Erkrankungen unterliegt komplexen Geneinflüssen, das bedeutet, dass man bei ihnen nicht eine bestimmte Mutation nachweisen kann, die die Krankheit direkt verursacht. Vielmehr führen die verschiedenen genetischen Variationen und Umwelteinflüsse zu unterschiedlichen Risiken, eine bestimmte Erkrankung zu erleiden. Die Erforschung der genetischen Grundlagen von weit verbreiteten Erkrankungen mit komplexem Vererbungsmuster stellt dabei eine ungleich größere Herausforderung dar, als die Identifizierung der krankheitsverursachenden Gene bei monogenen Erkrankungen. Trotz des Vorhandenseins einer bestimmten Mutation, die zu einer Krankheit prädisponiert, entwickeln einige Individuen diese Krankheit nicht. Man spricht hier von inkompletter Penetranz. Gleichzeitig kann ein Individuum, welches die Mutation nicht geerbt hat, trotzdem, ausgelöst durch Umweltfaktoren, die Krankheit entwickeln (Phänokopie) [1]

In der Folge der Veröffentlichung des humanen Genoms ist eine öffentliche Datenbank mit mehr als 1,5 Millionen SNPs (Einzelbasenaustausche, single nucleotide polymorphisms) entstanden. Da der Umfang dieser Datenbank die Möglichkeit, jedes Gen und jeden Einzelbasenaustausch systematisch zu analysieren, unmöglich macht, was wahrscheinlich auch nur bedingt sinnvoll wäre, gilt es, bestimmte Gene herauszusuchen, denen bei der Entstehung von Krankheiten eine besondere Rolle zukommt. Informationen aus familienbasierten Studien, vorhandenes Wissen über ähnliche, assoziierte Erkrankungen, Kenntnisse der Pathogenese der Erkrankung, Kenntnisse des Gens und seiner Funktionen können Hinweise auf Kandidatengene und deren Lokalisation geben.

Um krankheitsassoziierte Gene zu identifizieren stehen insbesondere vier unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Bei der funktionsspezifischen Klonierung versucht man das Gen über sein Genprodukt zu identifizieren, indem man genspezifische Oligonukleotide oder, über das Genprodukt erzeugte, spezifische Antikörper herstellt und diese zur Suche in cDNA-Datenbanken einsetzt. Ein anderer Weg ist die positionelle Klonierung. Bei diesem Verfahren muss nur die Zuordnung zu einer chromosomalen Teilregion bekannt sein (z.B. über Kopplungsanalyse). Über physikalische und genetische Kartierung versucht man die Genloci und Kandidatengene genauer zu lokalisieren. Die positionelle Klonierung verliert durch das positionelle Kandidatengenverfahren zunehmend an Bedeutung. Bei diesem Verfahren muss die chromosomale Teilregion für einen Krankheitslocus bereits bekannt sein. Über Datenbanken kann man anschließend Kandidatengene identifizieren. Da uns durch das Humangenomprojekt die Information über die Zuordnung von Genen zu bestimmten Chromosomenbereichen zur Verfügung steht, ist diese Methode gegenwärtig die erfolgreichste. Auch das positionsunabhängige Kandidatengenverfahren wurde durch das positionelle weitgehend abgelöst. Diese Methode geht nicht von der Zuordnung zu einer bestimmten Region aus, sondern sie versucht über Homologien von Phänotypen im Tierreich oder beim Menschen, für die ein Gen bereits bekannt ist, zu prüfen, ob das Gen zu einer bereits bekannten Genfamilie gehören könnte. Allerdings war dieser Ansatz bis jetzt selten erfolgreich [2]. Ist ein Kandidatengen identifiziert worden, muss es analysiert werden. Varianten in der DNA-Sequenz werden gesucht.

Wurde ein Polymorphismus neu beschrieben, so sollten Untersuchungen durchgeführt

werden, welche die funktionellen Unterschiede belegen, die ein Polymorphismus bewirkt. Bei Polymorphismen, die durch den Verlust einer bestimmten Funktion gekennzeichnet sind, lässt sich der Beweis *in vitro* erbringen, indem man eine Zelllinie, die den Polymorphismus exprimiert mit einem geklonten Wildtypallel transfiziert und auf diese Art und Weise den Wildtypphänotyp hervorruft. Eine weitere Methode ist das Konstruieren eines Tiermodells, in dem, je nach Mutationsart, das betreffende Gen ausgeschaltet (*Knockout*) oder das mutierte Allel eingefügt wird (*Transgen*) [3]. In Assoziationsstudien werden im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien Allelfrequenzen von betroffenen mit den Frequenzen von nicht-betroffenen Individuen verglichen, woraus Aussagen zur Assoziationsstudien ermöglichen das Arbeiten mit sehr hohen Fallzahlen und demzufolge mit einer großen statistischen Aussagekraft. Ein Beweis kann mit dieser Methode allein jedoch nicht erbracht werden, zusätzliche funktionelle Untersuchungen sollten eine Kausalität belegen [4].

In den letzten Jahren wurden viele Arbeiten über den Einfluss von Genpolymorphismen auf Krankheiten, insbesondere auch auf Lebererkrankungen, veröffentlicht. Diese Studien ergaben im Fall der Lebererkrankungen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, welche sich in einigen Fällen durch unzureichendes Studiendesign, zu kleine Fallzahlen, selektionierte Patienten (z.B. tertiäre Zuweisungszentren), zu wenig oder schlecht ausgewählte Kontrollen oder der Anwendung von nicht etablierten molekularbiologischen Methoden erklären lassen. Die widersprüchlichen Ergebnisse unterstreichen aber noch einmal die Schwierigkeit, komplexe Merkmale zu erforschen und die Notwendigkeit sorgfältiger Studien, welche der Komplexität des Geneinflusses gerecht werden. Es ist wichtig, Gene mit einer klaren pathophysiologischen Funktion und/oder einem biologischen Korrelat zu untersuchen, auf welches man sich in der Studie beziehen kann. Nicht außer Acht gelassen werden dürfen außerdem das Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, die Ethnizitäten, der Hormonstatus, das Alter, das Geschlecht, und exogene Faktoren, wie die Einnahme von Medikamenten und der Alkoholkonsum [1, 4].

1.1.2 Klinische Bedeutung des Wissens um Krankheits-assoziationen

Die Erkenntnis über Geneinflüsse auf die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten bietet, außer einem tieferen Verständnis der Krankheiten, auch die Möglichkeit, Personen mit erhöhtem Risiko zu identifizieren und engmaschig zu *screenen*, Krankheiten im Frühstadium diagnostizieren und therapieren zu können und Therapien auf Patienten individuell abstimmen zu können. Das Wissen um die Krankheitsassoziationen von Genen ist für ein vollständiges Verständnis von Krankheiten und für die Entwicklung möglicher zukünftiger Therapiestrategien unerlässlich.

1.1.3 Entstehung von Leberfibrose

Leberfibrose ist die Folge einer andauernden Wundheilungsreaktion der Leber auf verschiedene Noxen, seien sie viraler, autoimmuner, toxischer oder cholestatischer Art. Ein kontinuierlicher Untergang von Hepatocyten führt über einen längeren Zeitraum zu einer Entzündungsreaktion und zu einer Bindegewebsvermehrung (Fibrose). Schreitet der Prozess fort, kommt es durch ungeregeltes bindegewebiges Wachstum zur Zerstörung der Läppchenarchitektur, Ausbildung von Pseudolobuli und zur Störung der Gefäßversorgung (Cirrhose). Die Leberfibrose ist, unabhängig von der Ätiologie, durch die Aktivierung von hepatischen Sternzellen im Rahmen einer entzündlichen Leberreaktion gekennzeichnet. Eine ganze Reihe von Mediatoren wie Cytokine und Akute-Phase-Proteine greifen in den Prozess ein, steuern und beeinflussen ihn. Beim Untergang von Hepatocyten werden chemotaktisch wirksame Substanzen freigesetzt, die zur Aktivierung und zum Einwandern von Entzündungszellen (Lymphocyten, Granulocyten, Kupfferzellen, Sternzellen) in den Nekrosebereich führen. Durch die Aktivierung von Sternzellen werden u.a. Interleukine freigesetzt und es findet eine Umwandlung in proliferative, bindegewebsbildende, kontraktile Myofibroblasten statt. Kupfferzellen setzen reaktive Sauerstoff- und Peroxidmoleküle (ROS) frei, welche zusätzlich die Sternzellaktivität anregen. Es kommt zur Bildung von extrazellulärer Matrix und zur Zellproliferation. Insgesamt nimmt die Zahl der Hepatocyten zugunsten der nichtparenchymalen Zellen ab. Der Anteil an extrazellulärer Matrix nimmt zu, dabei ändert sich auch deren Zusammensetzung zugunsten des Kollagen-Typ-IV-Anteils, Fibronektin und Elastin [5, 6]. Im Dissé'schen Raum wird Kollagen abgelagert, es kommt zur Ausbildung

von Basalmembranen im Bereich der Sinusendothelien, die Sinusoiden werden eingeengt und rarefizieren. Die Hepatozyten werden balloniert, es bilden sich arterioportale Anastomosen / Kurzschlüsse aus, die zu einer Druckerhöhung in den Sinusoiden führen [7]. Das Zusammenspiel von vielen Mediatoren macht die Leberfibrose zu einem dynamischen Prozess, der durch eine Vielzahl von Faktoren moduliert wird.

Es sind eine Reihe von Faktoren bekannt, die das Fortschreiten der Leberfibrose beeinflussen; dazu gehören Alter, Geschlecht, BMI, Krankheitsdauer, Entzündungsaktivität und Alkoholkonsum. Poynard et al. haben diese Zusammenhänge näher untersucht. Das Alter in dem 50% der Erkrankten eine Cirrhose entwickelt haben, hängt von der Grunderkrankung ab. Bei einer HCV/HIV-Koinfektion scheint die Krankheit besonders schnell fortzuschreiten, hier haben 50 % der Patienten mit 52 Jahren bereits eine Cirrhose entwickelt. Bei Alkoholkranken sind es 61 Jahre, bei HBV-Infizierten 65 Jahre, bei HCV-Infizierten und Patienten mit Hämochromatose 74 Jahre. Patienten mit PBC entwickeln zu 50% bis zum 81. Lebensjahr eine Cirrhose. Die Wahrscheinlichkeit eine Lebercirrhose zu entwickeln steigt außerdem mit der Krankheitsdauer. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer, nach der 50% der Patienten eine Cirrhose entwickeln, beträgt bei HCV/HIV- Koinfektion 28 Jahre, bei Alkoholabusus 35 Jahre, bei HCV-Infektion 43 Jahre und bei HBV-Infektion 64 Jahre. Der Prozess der Leberfibrose läuft jedoch nicht linear mit der Erkrankungsdauer, sondern wird außerdem vom Alter des Patienten beeinflusst. Ein höheres Lebensalter stellt einen Risikofaktor zum schnelleren Fortschreiten von Fibrose dar. Bei Männern wurde mit zunehmendem Alter eine akzelerierte Progression beschrieben. Bei Frauen hingegen beschrieb man bei HBV, HCV, Hämochromatose und PBC einen eher biphasischen Verlauf der Fibroseprogression. Bei Frauen wurde im Vergleich zu Männern ein langsameres Fortschreiten der Fibrose sowohl bei der HCV-Infektion, als auch der Hämochromatose beobachtet. Beim Alkoholabusus hingegen wurde bei Frauen ein schnelleres Fortschreiten, bei durchschnittlich späterer Exposition, beschrieben. Die beobachteten Unterschiede in der Fibroseprogression bei Männern und Frauen legt den Einfluss von genetischen Faktoren nahe. Ein erhöhter BMI (>28) korreliert mit dem Schweregrad der Leberfibrose und mit dem Risiko eine Cirrhose zu entwickeln. Hoher Alkoholkonsum bei gleichzeitig bestehender chronischer Leberekrankung beschleunigt den Fibrosierungsprozeß und senkt das durchschnittliche Alter bei Cirrhoseentwicklung: bei einer HIV/HCV-Koinfektion von 28 auf 19 Jahre, bei HCV-Infizierten von 43 auf 29 Jahre, bei HBV-

Infizierten von 75 auf 46 Jahre und von 75 auf 61 Jahre bei Patienten mit Hämochromatose. Mittlere und schwere Entzündungsaktivitäten bei HIV/HCV-, HBV-, HCV- und PBC-Erkrankten beschleunigen, verglichen mit leichter Entzündungsaktivität, den Fibroseprozess [5, 8]. Die vorliegenden Daten zeigen die Wichtigkeit, Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht, die die natürliche Fibroseprogression beeinflussen, in genetische Studien als Kofaktoren mit einzubeziehen.

Man spricht in Bezug auf das Entstehen einer Leberfibrose und schlussendlich einer Lebercirrhose, von "slow- und fast-fibrosers" und meint damit, daß nicht alle Patienten mit gleicher Exposition oder schädigendem Agens in gleichem Maße und gleicher Geschwindigkeit eine Leberfibrose entwickeln. Daß diese individuellen Unterschiede nicht nur von Umweltfaktoren, sondern auch von genetischen Faktoren abhängen, ist inzwischen in einer Reihe von Studien belegt worden. Die Mechanismen, wie Gene das Fortschreiten von Leberfibrose beeinflussen, sind vielfältig und setzen an unterschiedlichen Stellen im Pathomechanismus an (siehe Abb. 1 und Tab. 1).

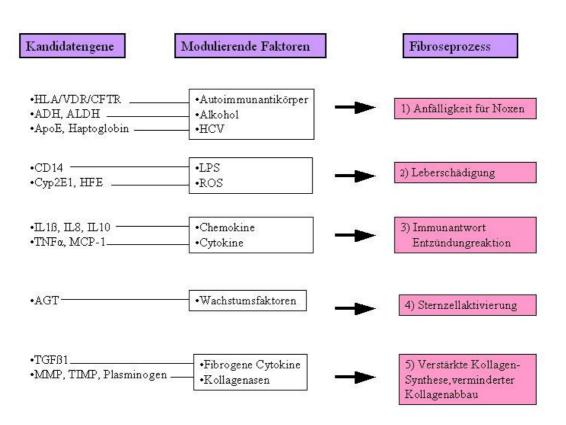


Abb. 1: Angriffsorte und Modulationsmechanismen von Kandidatengenen in der Pathogenese von Leberfibrose.

Gene können die Pathogenität von hepatotoxischen Substanzen beeinflussen, in dem sie beispielsweise die Produktion der alkoholmetabolisierenden Enzyme regulieren. Die ADH-, ALDH- oder CYP2E1-Gene werden damit in Zusammenhang gebracht, wobei die Studienergebnisse bis jetzt widersprüchlich sind. Übermäßiger Alkoholkonsum führt bei Sättigung der Alkoholdehydrogenase zur Induktion von Cytochromen, die ebenfalls Alkohol abbauen können. Insbesondere bei den Cytochromen CYP2E1 und CYP4A fallen dadurch reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS) an, welche den Prozess der Leberfibrose beschleunigen. Die Regulierung der Immunantwort wird durch Gene beeinflusst und somit auch die Entstehung und der Verlauf einer Autoimmunerkrankung oder einer viralen Infektion. Beispiele hierfür sind das Interleukin-1ß (IL-1ß-Gen), sowie das Gen zur Transkription von Tumor-Nekrosefaktor-Alpha (TNF-alpha-Gen). Beide führen bei einer Hochregulierung der Transkription zu einer verstärkten Entzündungsreaktion [9-12]. Der Transformierende Wachstumsfaktor Beta 1 (TGFB1)- sowie Angiotensin II haben nachgewiesener Maßen eine fibrogene Wirkung, beispielweise durch Steigerung der Kollagensynthese. Andere wiederum, wie das Plasminogen-Gen unterstützen die Fibrosierung durch eine Verhinderung des Kollagenabbaus [13]. Eine schwerere Fibrose und stärkere Entzündungswerte wurden bei Hepatitis-C-Patienten mit einer Mutation in der Promoter Region des "Monocyte-Chemotactic-Protein-1" (MCP-1) -Gens beobachtet. Träger des G-Allels haben höhere MCP-1-mRNA Konzentrationen und eine erhöhte MCP-1-Sekretion aus den hepatischen Sternzellen [14]. Wozniak et al. beobachteten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C, dass eine Mutation im Apolipoprotein-E-4-Gen (APO-E-epsilon-4-Allel) einen protektiven Effekt bezüglich Leberschädigung hat [15]. Man kann sich diese Tatsache dadurch erklären, dass das Apo-E-epsilon-4-Allel zu Veränderungen der Lipoproteine und nachfolgender verminderter Virusaufnahme in die Zelle führt [16, 17]. Im "Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4" (CTLA-4)-Gen, welches die T-Zell Funktion reguliert, sind zwei Polymorphismen bekannt, die vermehrt bei Patienten mit einer Autoimmunerkrankung anzutreffen sind [18].

Tab. 1: Genpolymorphismen, welche das Fortschreiten von Leberfibrose beeinflussen, mit ihrer Funktion, ihren bekannten Genotypen, ihrer funktionellen Relevanz, ihrem Effekt auf Fibrose, sowie den veröffentlichten Studien.

Gen	Funktion	Genotyp	Funktionelle Relevanz	Effekt auf Fibrose	Referenz
IL-10	Antiinflammatorisch	-627-> A	Vermind. Transkription	Zunahme	Grove et al [19]
TGFB1	Profibrogen	Cod 25A->Arg	Erhöhte Produktion	Zunahme	Powell et al.[13]
IL-1ß	Proinflammatorisch	-511C->T - 3953T>C	Vermehrte Sekretion	Zunahme	Takamatsu et al. [9] Donaldson et al [10]
AGT	Profibrogen, Sternzellaktivierung	-6G->A	Erhöhte Transkription	Zunahme	Powell et al.[13]
ALDH	Ethanol Metabolis- mus	ALDH2 c2/c2 Allel	Abnorme Funktion	Widersprüchl. Daten	Day et al. [20] Okamoto et al. [21]
TNF-α	Proinflammatorisch	-308G->A	Erhöhte Transkription	Zunahme	Powell et al. [13] Grove et al. [12] Yee et al. [22]
HFE	Eisenresorption	-845G->A	Abnorme Lokalisation	Widersprüchl. Daten	(George et al. [23] Chitturi et al. [24] Martinelli et al. [25] Smith et al. [26] Thoburn et al. [27]
CTLA-4	Immunantwort	-66A->G -318C>G	Erhöhte Transkripton, verminderte T- Zellinhibition	Zunahme	Stewart et al.[28] Schott et al. [29]
TLR 7	Immunantwort	-32A>T -1-120T>G -2403G>A		-Zunahme -Protektiv -Protektiv	Schott et al. [30] [31]
АроЕ	Virusaufnahme	E4 Allel	Abnorme Funktion LDL-Erhöhung	Zunahme	Corpechot et al. [32]

1.2 Das Mannose-Binding-Lectin (MBL) und genetische Variabilität im MBL Gen

1.2.1 Das Mannose-Binding-Lectin

Das Mannose-Binding-Lectin ist ein Collectin, ein Protein mit kollagenartigen und C-Typ-Lectinartigen Regionen. Dieses 25 kDa grosse Polypeptid lagert sich mit zwei weiteren Polypeptiden als Triplett zu einer funktionellen Untereinheit zusammen. Ein kleiner Teil der Tripletts bildet wiederum Oligomere (siehe Abb. 2).

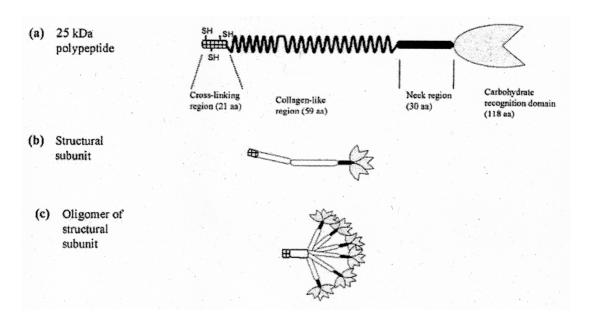


Abb. 2: Struktur und Organisation des MBL-Proteins als Polypeptid (a), Triplett (b), sowie in Form eines Oligomers (c) nach Presanis [33].

MBL spielt vor allem für die angeborene Immunität eine große Rolle und kann über eine zugehörige Serum-Protease MASP (MBL-Activating-Serum-Protease) das Komplementsystem aktivieren [34]. Es bindet eine Vielfalt von Mikroorganismen, die es durch bestimmte sich wiederholende Zuckermoleküle erkennt und die es opsoniert. Dabei handelt es sich um ein Akute-Phase Protein, dessen Serumkonzentration bei Traumen, Operationen und auch Infektionen ansteigt [35, 36]. MBL wird in der Leber von Hepatozyten synthetisiert und ins Blut sezerniert. Es ist ein vorwiegend intravaskuläres Protein,

das aber auch in Synovialflüssigkeit, Exsudaten, Aszites, Urin und im Fruchtwasser von Schwangeren mit frühzeitiger Wehentätigkeit gefunden werden kann [37].

Die Erstbeschreibung von MBL, damals noch MBP (Mannose-Binding-Protein) genannt, erfolgte 1968 bei einem 3 Monate alten Kind, welches unter schwerer atopischer Dermatitis und wiederkehrenden bakteriellen Infektionen litt und bei dem Miller et al. einen Phagocytosedefekt feststellten [38]. Kurz darauf stellte sich heraus, dass dieser Phagozytosedefekt bei fünf bis zehn Prozent der Bevölkerung vorhanden ist. Später wurde der Defekt mit dem Fehlen eines Serumproteins in Verbindung gebracht und MBL Anfang der 70er Jahre von Robinson et al. aus einer Leber extrahiert. 1987 gelang es Ikeda et al. zu zeigen, dass MBL das Komplementsystem aktivieren kann [39]. 1989 konnten Super et al. schließlich zeigen, daß der Phagozytosedefekt durch einen niedrigen MBL-Plasmaspiegel zustande kommt [40].

1.2.2 Genetische Varianten des MBL

Auf dem Chromosom 10 befindet sich das sogenannte *MBL2-Gen*. Die Protein codierende Region besteht aus vier Exonen, die durch drei Introns von jeweils 600, 1350 und 800 Basenparen unterbrochen werden (siehe Abb. 3). Die Nukleotidsequenz des *MBL-Gens* wurde unabhängig voneinander von Sastry et al. und von Taylor et al. im Jahr 1989 publiziert [41, 42].

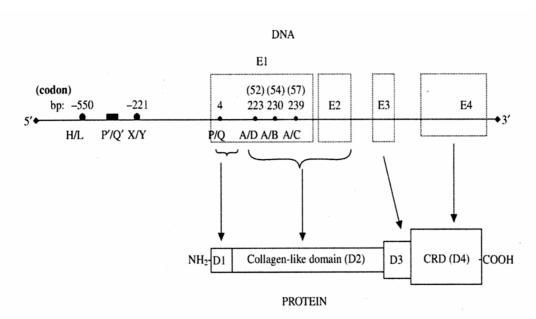


Abb. 3: Aufbau des MBL-Gens mit Lage der bekannten Punktmutationen, sowie Struktur des MBL-Proteins nach Kilpatrick [43].¹.

Drei Punktmutationen in der kollagencodierenden Region im Exon 1, zwei weitere in der Promotorregion, sowie eine in der 5'untranslatierten Region (5'UTR) beeinflussen den MBL-Plasmaspiegel [45]. Durch die Punktmutationen in der Exon-1-Region wird am Codon 52 Arginin durch Cystein ersetzt, am Codon 54 wird Glycin durch Aspartat und am Codon 57 Glycin durch Glutamat ersetzt. Diese Polymorphismen werden auch D (52), B (54) und C (57) genannt, A ist die Bezeichnung für den Wildtyp. Sie führen durch eine abnormale Sekundärstruktur des Tripletts dazu, dass kein biologisch funktionierendes MBL gebildet werden kann [46]. Homozygote Mutationsträger und Compound Heterozygote (d.h. mit 2 heterocygoten Mutationen im Exon 1) haben kein im ELISA nachweisbares MBL, ihr MBL kann kein MASP binden und das Komplementsystem nicht aktivieren. Während Wildtyp-MBL ein durchschnittliches Molekulargewicht von 500 KDa hat, liegt der Durchschnitt von Homozygoten und Compound Heterozygoten bei

¹ Anmerkung: Die Nummerierung der Polymorphismen erfolgte nach den Empfehlungen der "Nomenclature Working Group for Human Gene Mutations" [44] Antanarakis S. Nomenclature Working Group recommendations for a nomenclature systhem for human gene mutations. Hum Mutat 1998;11:1-3...

150 KDa, was man als Ausdruck der Unmöglichkeit höher oligomerisiertes Protein zu produzieren ansehen kann. Heterozygote Mutationsträger haben währenddessen eine zehnprozentige Aktivität mit vor allem monomerischen Tripletts, während Wildtypen MBL besitzen, das aus Dimeren, Trimeren, Tetrameren und einem kleinen Prozentsatz Oligomeren besteht, die besonders effektiv das Komplementsystem aktivieren. Proteine mit einer Mutation auf Codon 52 (A/D) scheinen stabiler zu sein und sind höher oligomerisiert, als solche mit der A/C und A/B Variante [47] (siehe Tab. 2 und Abb. 4). In der Promotorregion sind die H/L Mutation auf Position -550 und die X/Y-Mutation auf Position –221, bezogen auf den Transkriptionsstart, bekannt. Bei dem H/L- und X/Y-Polymorphismus ist jeweils ein Guanin durch ein Cytosin ersetzt. Dabei sind H und Y mit einer jeweils höheren MBL-Konzentration als ihr Allel assoziiert, wobei ein X-Träger deutlich geringere MBL-Konzentrationen aufweist, als ein L-Träger [38]. Ein weiterer bekannter Polymorphismus ist der P/Q-Polymorphismus, bei dem Cytosin mit Thymin vertauscht ist und der sich auf der 5'UTR in Position 649 im Exon 1 befindet. Bei den P/Q-Allelen scheint es, dass Menschen mit dem seltener vorkommenden Q-Allel eine höhere MBL-Konzentration haben, als diejenigen mit dem P-Allel [48]. Zwischen dem X-Allel und dem Wildtyp-Allel A besteht ein Kopplungsgleichgewicht. Dieses bedeutet, dass das X-Allel immer mit dem Wildtypallel (A) einhergeht [47]. Die anderen Exon-1-Polymorphismen werden hingegen unabhängig vererbt. Die Mutationen in der Promotorregion modulieren die MBL-Konzentration, indem sie die Transkription beeinflussen. Die P/Q-Mutation in der 5'UTR hingegen beeinflusst die Translation.

Trotz zehn verschiedener Allele (A,B,C,D,H,L,X,Y,P und Q) sind, u.a. aufgrund gestörter Kopplungsgleichgewichte (*linkage desequilibrium*), nur sieben verschiedene Haplotypen (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC und HYPD) beschrieben worden. Madsen ordnet hierbei HYPA der größten MBL-Konzentration zu. LYQA, LYPA und LXPA entsprechen mittelgradig reduzierten MBL-Konzentrationen (LYQA mittel-hoch, LYPA mittel, LXPA mittel-niedrig). Die Haplotypen LYPB, LYQC und HYPD stuft der Autor als fehlerhaft, d.h. kein wirksames MBL produzierend ein (siehe Tab. 3). Trotz der gut dokumentierten unterschiedlichen mittleren MBL-Konzentrationen in Abhängigkeit vom jeweiligen Haplotyp, existieren jedoch innerhalb der einzelnen Haplotypen breite interindividuelle und auch interethnische Varianzen [33].

Tab. 2: Auswirkungen des Genotyps der Exon-1-MBL-Polymorphismen auf die MBL-Konzentration im Serum.

Genotyp	Konzentration des funktionell wirksamen MBLs
Homozygote Wildtypen (AA)	hoch/normal
Heterozygote (A/B, A/C, A/D)	gering-mittel (10% Aktivität)
Homozygote und Compound Heterozygote (B/B, C/C, D/D, B/C, B/D, C/D)	nicht vorhanden

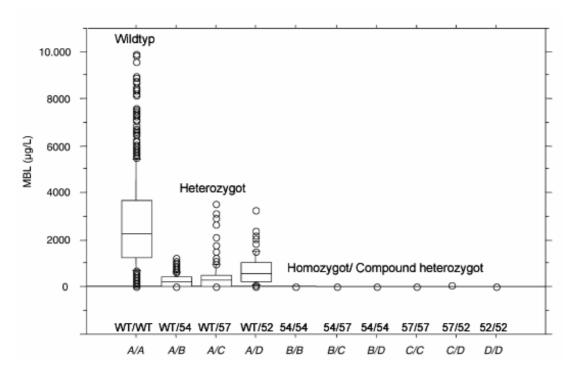


Abb. 4: MBL-Serumkonzentrationen in Abhängigkeit des Exon-1-Genotyps bei Kaukasiern nach Garred [47].

Tab. 3: Auswirkungen des MBL-Haplotyps auf die Serumkonzentrationen von funktionellem MBL nach Madsen [48].

Haplotyp	Konzentration des funktionell wirksamen MBLs
НҮРА	hoch/mittel
LYQA	hoch/mittel
LYPA	mittel
LXPA	niedrig/mittel
LYPB	nicht vorhanden
LYQC	nicht vorhanden
HYPD	nicht vorhanden

1.2.3 Epidemiologie

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit den Frequenzen der MBL-Polymorphismen in verschiedenen ethnischen Gruppen beschäftigt [48-50]. Zusammenfassend kann man feststellen, dass der Polymorphismus B am Codon 54 am häufigsten bei Europäern vorkommt, während sich der Polymorphismus C am Codon 57 am stärksten in Afrika südlich der Sahara ausgebreitet hat. Der Polymorphismus D auf Codon 52 kann keiner besonderen Bevölkerungsgruppe zugeordnet werden. Dieser Polymorphismus ist wesentlich seltener anzutreffen, als der B- und C-Polymorphismus [46] (siehe Tab. 4, 5 und 6).

Tab. 4: Frequenz der Exon-1-Allele in zehn verschiedenen Populationen nach Turner [46].

Population	Codon 52	Codon 54	Codon 57
Großbritannien	0.06	0.16	0.00
Dänemark	0.05	0.13	0.02
Hongkong	0.01	0.11	0.00
(Chinesen)			
Grönland	0.00	0.13	0.00
(Eskimos)			
Papua Neu	0.00	0.07	0.00
Guinea			
Vanuatu	0.00	0.01	0.00
Gambia	0.02	0.00	0.29
Kenya	0.05	0.03	0.23
Xhosa (S.Afrika)	0.00	0.00	0.27
San Bushmen	0.00	0.03	0.07
(Namibia)			

Tab. 5: Frequenzen des XY-Allels bei Eskimos, Europäern und Afrikanern nach Madsen [51].

Population	X-Allel	Y-Allel
Eskimos (n=69)	0.029	0.971
Europäer (n=120)	0.238	0.673
Afrikaner (n=61)	0.270	0.730

Tab. 6: MBL-Haplotypenfrequenzen in verschiedenen Populationen nach Madsen [51].

	НҮРА	LYQA	LYPA	LXPA	LYPB	LYQC	HYPD
Population	(wt)						
Mozambiquaner	0.06	0.27	0.30	0.13	0	0.24	0
Chiriguanos	0.54	0.01	0.02	0.01	0.42	0	0
Mapuches	0.38	0	0.08	0.04	0.46	0.04	0
Dänen	0.31	0.19	0.04	0.26	0.11	0.03	0.06
Kenianer	0.08	0.25	0.13	0.24	0.02	0.24	0.04
Eskimos	0.81	0	0.04	0.03	0.12	0	0

Die Verteilung der Exon-1-Polymorphismen deutet auf unterschiedliche Selektionsdrücke in den Populationen hin. Die hohe Frequenz von Polymorphismen im *MBL-Gen* (besonders bei Afrikanern) legt nahe, dass niedrige MBL-Konzentrationen nicht nur zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen, sondern, dass sie sich unter bestimmten Bedingungen auch positiv auf das Überleben auswirken könnten. Garred et al. erklären sich dieses Phänomen durch einen Überlebensvorteil der Heterozygoten, die einen niedrigen MBL-Plasma-Spiegel besitzen. Trotz eines niedrigeren MBL-Spiegels als bei den Wildtypen sind die Heterozygoten noch in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren. Gleichzeitig schützt der niedrige MBL-Spiegel vor einem Eindringen intrazellulärer Mikroorganismen und Parasiten in die Zellen. Mycobacterien, Legionellen oder Trypanosomen müssen phagocytiert werden, um die Wirtszellen befallen zu können. MBL spielt dabei eine wichtige Rolle [52]. Niedrige MBL-Konzentrationen stellen dieser These zufolge durch eine abgeschwächte Komplement-aktivierung, einen Schutz vor Entzündung und dazu gehöriger Gewebeschädigung dar [53].

1.2.4 Rolle in der Immunantwort

MBL besitzt eine wichtige Aufgabe in der angeborenen, unspezifischen Immunität. Durch Opsonierung und Komplementaktivierung nimmt es Einfluss auf Phagocytose und Entzündungsreaktion. Besonders in der frühkindlichen Periode, zwischen dem

Verschwinden mütterlicher Antikörper und dem Aufbau der eigenen spezifischen Abwehr, spielt MBL eine große Rolle.

An seiner Oberfläche besitzt MBL Zuckermoleküle, die für Mikroorganismen spezifische Strukturen erkennen, welche auf Säugerzellen praktisch nicht vorkommen [37]. In Anwesenheit von Calcium bindet MBL an Mannose und N-Acetylglucosamin und ist auf diese Art und Weise in der Lage unterschiedlichste pathogene Keime zu opsonieren, dazu gehören Bakterien, Viren, aber auch Hefen, wie zum Beispiel *Candida albicans*.

Durch das Binden an Liganden ist MBL außerdem in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren. Die MBL-Aktivierung des Komplementsystems unterscheidet sich von der klassischen Aktivierung durch eine MASP (MBL-Activating-Serum-Protease) und durch das Erkennen von Zuckern anstatt von hydrophoben Molekülen. Für diese C1q und Antikörperunabhängige Komplementaktivierung ist durch Thiel et al. der Begriff "MB-Lectin-pathway of complement activation" (Lectinabhängige Komplementaktivierung) entstanden [54]. Anstatt wie C1q (in der klassischen Komplementkaskade) mit C1r und C1s einen Komlex zu formen, bindet MBL an MASP 1 und 2. MASP 2 spaltet dann C2 und C4 zur C3 Konvertase. Ab diesem Punkt verlaufen der klassische und der Lectinweg der Komplementaktivierung gleich [33] (siehe Abb. 5). Die Fähigkeit Komplement zu aktivieren und an MASP zu binden ist vom Grad der Oligomerisierung abhängig, wobei die Wirksamkeit des MBL's mit der Höhe der Oligomerisierung zunimmt [43].

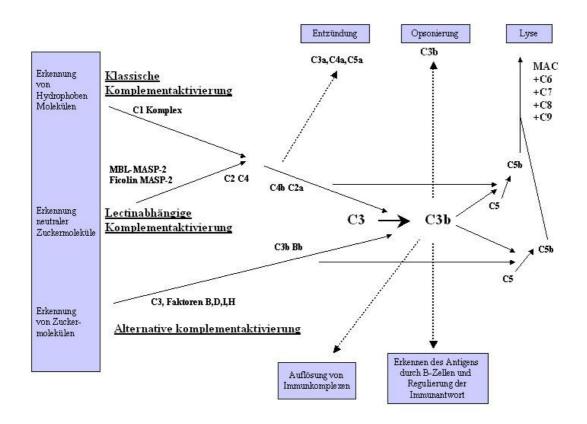


Abb. 5: Unterschiedliche Mechanismen der klassischen, lectinabhängigen und alternativen Komplementaktivierung mit Komplementfaktoren und nachfolgenden Prozessen.

Verschiedene Studien weisen auf zusätzliche Aufgaben von MBL hin. Als Akute-Phase-Protein hat MBL eine "Präantikörper"- (ante-antibody-) Funktion, indem es nach Primärkontakt, bis die IgM-Antwort induziert ist, an das Antigen bindet [35]. Roos et al. fanden heraus, dass MBL außerdem, über das Binden an IgA die Komplementkaskade aktivieren kann [55]. Tenner et al. entdeckten auf der Oberfläche von Makrophagen, Monocyten und Neutrophilen einen MBL-Rezeptor, der darauf hindeutet, dass MBL auch direkt zur Phagocytose beiträgt [56]. Ogden et al. entdeckten die Fähigkeit des MBL's apoptotische Zellen zu binden und damit ihre Lyse in Gang zu setzen [57]. Für intrazelluläre Parasiten und Mikroorganismen hat MBL eine besondere Bedeutung, da es als Eintrittspforte in den Wirt fungiert, denn intrazelluläre Pathogene müssen phagocytiert werden, bevor sie in der Lage sind die Wirtszellen zu befallen. Hierzu gehören unter anderem Mycobakterien, Legionella pneumophilia und Trypanosoma cruzii [52].

1.3 MBL-Polymorphismen und Erkrankungen

Die Höhe der Serum-MBL-Konzentration ist vom MBL-Genotyp abhängig. Die MBL-Polymorphismen mit ihren resultierenden niedrigen MBL-Serumkonzentrationen sind einer der am häufigsten auftretenden Immunvarianten. Es liegt die Vermutung nahe, dass Personen, die aufgrund bestimmter MBL-Varianten niedrigere MBL-Konzentrationen aufweisen, ein höheres Risiko für Infektionskrankheiten haben. In den letzten Jahren wurde ausgiebig zum Thema geforscht und es wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die teilweise den Einfluss von MBL-Polymorphismen auf bestimmte Krankheiten bestätigten und in anderen Fällen zu kontroversen Ergebnissen führten.

Das MBL-Protein spielt bei vielen Infektionskrankheiten eine komplexe Rolle. So wurden beispielsweise Polymorphismen im MBL-Gen bzw. niedrige MBL-Konzentrationen in Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von schweren respiratorischen Infekten bei Kleinkindern gebracht [58, 59]. Eine vermehrte Anfälligkeit für eine Meningokokken-Meningitis wurde von Hibberd et al. in England bei durchschnittlich 5- bis 6-jährigen Kindern mit MBL-Polymorphismen beobachtet [60]. Zwei weitere Studien aus Dänemark [61] und Norwegen [62] mit Jugendlichen und kleineren Fallzahlen konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Andererseits unterstützt die Arbeit von Hibberd et al. die Beobachtung, dass eine MBL-Defizienz vor allem bei Kleinkindern gravierende Auswirkungen haben kann. In weiteren Studien wurden unter anderem Zusammenhänge zwischen dem Auftreten und dem Verlauf von HIV-Infektionen [63, 64] untersucht, wobei die Ergebnisse voneinander divergieren. Eine Sonderrolle bei den Infektionen kommt den intrazellulären Bakterien und Parasiten zu. Bei Patienten mit Tuberkulose, Lepra und viszeraler Leishmaniose finden sich erhöhte MBL-Konzentrationen. Dieses Phänomen lässt sich durch die Rolle des C3-Rezeptors bei der Aufnahme der Erreger in die Zelle erklären. Hier wirkt sich eine niedrige MBL-Konzentration eher protektiv aus. Garred et al. beobachteten 1999 eine durchschnittlich schlechtere Lungenfunktion und schlechtere Überlebensraten bei MBL- Polymorphismusträgern mit Cystischer Fibrose [65].

Mullighan untersuchte als einer der ersten den kompletten Satz aller MBL-Polymorphismen an Patienten mit Common-Variable-Immunodeficiency (CVID). Er fand heraus, dass die Krankheit bei Polymorphismusträgern durchschnittlich zehn Jahre früher beginnt, und dass bei Patienten mit einem Q-Allel (welches zu einer Erhöhung der MBL-Konzentration führt) mehr Autoimmunkrankheiten auftreten [66]. Es gibt eine kleine Anzahl von Untersuchungen über die Assoziation von Autoimmunerkrankungen mit einer verstärkten MBL-Aktivierung. Beispielweise zeigten Endo et al. in einer Reihe von Studien Zusammenhänge zwischen MBL-Aktivierung und diversen Nierenerkrankungen, wie IgA-Nephritis [67], Purpura-Schönlein-Henoch-Nephritis [68] und Poststreptokokken Glomerulonephritis [69]. Demgegenüber stehen diverse Studien, die einen Zusammenhang von erniedrigten MBL-Konzentrationen und Autoimmunerkrankungen aufzeigen. In mehreren Studien wurden die erhöhte Frequenz von MBL-Mutationen bei Patienten mit SLE (systhemischer Lupus Erythematodes) beschrieben [70-72]. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis widersprechen sich die Studienergebnisse in Bezug auf das vermehrte Auftreten und den schlechteren Verlauf bei Polymorphismusträgern [73-77].

1.4 MBL-Polymorphismen und Lebererkrankungen

Auch der Einfluss von MBL-Polymorphismen auf Lebererkrankungen wurde in einigen Arbeiten untersucht. Es wird angenommen, dass sich die MBL-Konzentration über die Ebene der Immunantwort auf die Fibrosierung der Leber (welche das Endstadium fast aller Lebererkrankungen darstellt) auswirkt.

1.4.1 MBL-Polymorphismen und Hepatitis B

Thomas et al. berichteten 1996 als erste über ein vermehrtes Auftreten von Codon 52 Polymorphismen bei Hepatitis-B-Virus-Infektionen bei Europäern, nicht jedoch bei Asiaten. Eine Assoziation mit den Codons 54 und 57 konnte nicht festgestellt werden. Die Fallzahlen waren mit zwei Gruppen von 19 und 33 Patienten relativ niedrig [78]. Die Ergebnisse wurden durch zwei weitere Studien im Jahre 1998 ergänzt. Bellamy et al.'s Untersuchungen an 337 Hepatitis-B-Erkrankten fanden kein gehäuftes Auftreten von Polymorphismen am Codon 54 und 57. Das Codon 52 wurde leider nicht mit einbezogen [79]. Hoehler et al. konnten bei 89 HBV-Erkrankten kein vermehrtes Auftreten von

Codon-52- und 54- Polymorphismen feststellen [80]. Bei einer Untersuchung von Hepatitis-B- und -C-Patienten konnten Yuen et al. 1999 keine Häufung von Polymorphismen der Codons 52, 54 und 57 feststellen. Sie beobachteten jedoch ein gehäuftes Auftreten von Cirrhose und spontan bakterieller Peritonitis bei Patienten mit Codon-54-Polymorphismen [81]. Song fand in einer vietnamesischen Gruppe HBV-Infizierter ein gehäuftes Auftreten des Polymorphismus am Codon 54 und stellte bei ihnen auch höhere Transaminasen als bei Patienten mit dem Wildtyp fest [26]. Hakozaki et al. verglichen im Jahre 2002 HBV-infizierte Patienten mit fulminantem Leberversagen. Bei den Verstorbenen stellten sie ein höheres Vorkommen des 54er Polymorphismus fest [82]. Jae et al. untersuchten das Vorkommen des Polymorphismus am Codon 54 bei 498 koreanischen Hepatitis-B-Erkrankten. Sie konnten weder ein gehäuftes Vorkommen des Polymorphismus noch einen schwereren Krankheitsverlauf bei Polymorphismusträgern beobachten [83]. Chong et al. führten die bisher breiteste Studie mit 606 HBV-Infizierten chinesischen Patienten durch. Sie fanden kein vermehrtes Vorkommen des Codon 54 und des X/Y-Polymorphismus. Sie konnten aber bei Polymorphismusträgern eine schnellere Progression und eine höhere Komplikationsrate beobachten [84]. Thio et al. untersuchte 189 Hepatitis-B-Patienten mit Viruspersistenz, sowie 338 mit einer erfolgreich ausgeheilten Hepatitis-B-Infektion und konnten in der Gruppe mit Viruspersistenz ein signifikant erhöhtes Vorkommen an homocygoten und compound heterocygoten Mutationen finden [85].

1.4.2 MBL-Polymorphismen und Hepatitis C

Auch bei Studien mit HCV-Patienten blieben die Ergebnisse widersprüchlich. Matsushita und Kollegen untersuchten 93 japanische Patienten, bei denen sie kein vermehrtes Auftreten des 54er Polymorphismus feststellen konnten. Sie bemerkten jedoch eine Häufung des 54er Polymorphismuns bei Patienten, die nicht auf eine antivirale Therapie ansprachen ("Non-Responder") [86]. In einer Haplotypenuntersuchung mit 159 HCV-Infizierten und 218 Kontrollen zeigte sich bei bei Patienten mit X- und /oder B-Polymorphismus im Vergleich zu Patienten mit homocygotem Y- und A-Genotyp ein schlechteres Therapieansprechen [87]. Sasaki et al. fanden kein gehäuftes Auftreten des 54er Polymorphismus bei HCV-Patienten, beschrieben jedoch auch eine schnellere Krankheitsprogression bei B-Allelträgern [88]. Kilpatrick und Kollegen testeten 180

HCV-Patienten und 566 Kontrollen in Bezug auf ihre MBL-Serumkonzentrationen und fanden keinerlei Assoziationen, weder im Vorkommen, noch im Krankheitsverlauf [89].

1.4.3 MBL-Polymorphismen und Autoimmunerkrankungen

In Bezug auf die Leber betreffenden Autoimmunerkrankungen gibt es bis Dato weniger Untersuchungen. Matsushita beobachtete erhöhte MBL-Konzentrationen bei PBC-Patienten, woraus man schließen könnte, dass sich die Polymorphismen, welche zu einer Erniedrigung der MBL-Konzentration führen, im *MBL-Gen* protektiv auf das Auftreten von PBC auswirken [90]. Erklären kann man sich dieses Phänomen allerdings auch durch die Freisetzung von MBL als Akut-Phase-Protein im Rahmen der Entzündung. Gabolde et al. untersuchten Patienten mit cystischer Fibrose. Dabei fanden sie heraus, dass die Patienten, die eine Lebercirrhose entwickelten, überdurchschnittlich oft Polymorphismen im *MBL-Gen* hatten [91].

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die bisher durchgeführten Studien zum Einfluss der Polymorphismen im *MBL2-Gen* auf Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Ziel dieser genetischen Assoziationsstudie ist es, den Einfluss der Exon-1-Polymorphismen (B,C,D), sowie der Polymorphismen in der Promotorregion (X/Y) bzw. in der 5'UTR (P/Q) auf den Verlauf chronischer Lebererkrankungen in einer großen Population von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie zu untersuchen.

Besonders soll die Frage geklärt werden, inwiefern eine Assoziation zwischen genetischen MBL-Varianten und:

- Ätiologie der Lebererkrankung
- Fibroseprogression bzw. Ausmaß der Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Virus-Infektion
- Therapieresponse bei chronischer Hepatitis C besteht.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Population

3.1.1 Patienten

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 1468 Patienten mit chronischen Lebererkrankungenen eingeschlossen. Von ihnen waren 794 (54,1%) männlich und 672 (45,8%) weiblich (fehlende Angaben bei 2 Patienten) (siehe Tab. 7). Das Durchschnittsalter betrug 51,63 Jahre (siehe Tab. 8 und Abb. 6). 1216 Patienten (82,8%) waren deutscher Herkunft, 105 (7,2%) türkischer Herkunft, 92 (6,3%) sind den restlichen europäischen Ländern zuzuordnen. Mit einigem Abstand folgen 26 (1,8%) Patienten asiatischer, 23 (1,6%) arabischer und 6 (0,4%) afrikanischer Herkunft (siehe Tab. 9 und Abb. 7). Die Patienten wurden aus zwei unterschiedlichen Patientenkollektiven rekrutiert. 923 der 1468 Patienten (62,8%) sind aufgrund einer fortgeschrittenen Lebererkrankung in der Klinik für Allgemein-, Viszeralund Transplantationschirurgie an der Charité Campus Virchow-Klinikum in Berlin im Zeitraum 1988 bis 2003 lebertransplantiert worden und wurden in diesem Zentrum regelmäßig nachbeobachtet. Die übrigen 545 (37,2%) Patienten wurden aufgrund einer chronischen Lebererkrankung regelmäßig in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Campus Virchow-Klinikum betreut und behandelt. Aufgrund der zugrundeliegenden Lebererkrankung (Diagnose) wurden die Patienten insgesamt 8 Gruppen zugeordnet: Autoimmunhepatitis, Alkoholkrankheit, Kryptogene Cirrhose, Hepatitis B, Hepatitis C, nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD), primär biliäre Cirrhose und primär sklerosierende Cholangitis (siehe Tab. 10 und Abb. 8).

Alle Patienten wurden vom behandelnden Arzt über die Studie aufgeklärt und gaben dazu ihre schriftliche Einwilligung. Das Blut wurde jeweils im Rahmen von Routine-Blutabnahmen in einem zusätzlichen EDTA-Röhrchen (10 ml) abgenommen. Die Ethikkommision gab diesem Vorhaben für die Patienten der Medizinischen und Chirurgischen Klinik ein positives Votum.

Tab. 7: Geschlechtsverteilung im Patientenkollektiv.

Geschlecht	Anzahl n	Prozent
Männlich	794	54,1%
Weiblich	672	45,8%
Gesamt	1466	99,9%
Fehlend	2	0,1%
Gesamt	1468	100,0%

Tab. 8: Altersmittelwerte, -median und -verteilung im Patientenkollektiv.

Alter	Mittelwert	Anzahl n
Männlich	50,92	794
Weiblich	52,47	672
Insgesamt	51,63	1466

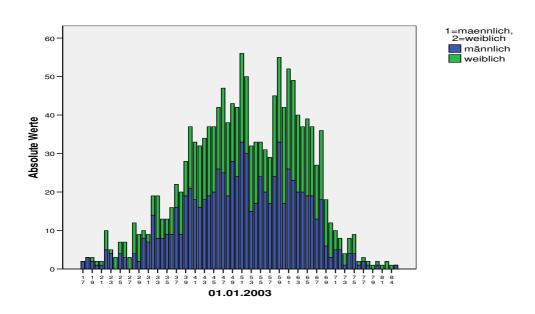


Abb. 6: Altersverteilung der Patienten in Abhängigkeit des Geschlechts.

Tab. 9: Ethnische Herkunft der Patienten.

Ethnische Herkunft	Anzahl n	Prozente %
Deutsche	1216	82,8
Türken	105	7,2
Andere Europäer	92	6,3
Asiaten	26	1,8
Araber	23	1,6
Afrikaner	6	0,4
Gesamt	1468	100,0

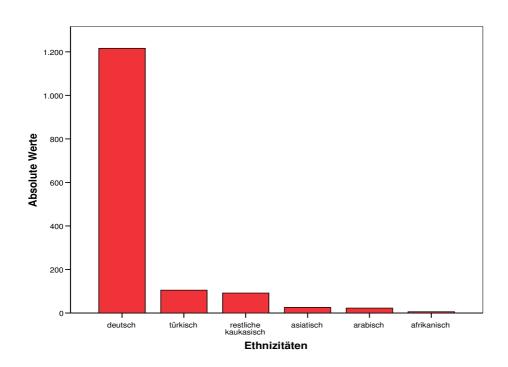


Abb. 7: Grösse der unterschiedlichen ethnischen Gruppen.

Tab. 10: Diagnosenhäufigkeiten im Patientenkollektiv.

Diagnosen	Häufigkeit n	Prozent %
AIH	97	6,6
Alkohol-toxisch	223	15,2
Kryptogen	68	4,6
HBV	199	13,6
HCV	621	42,3
NAFLD	49	3,3
PBC	153	10,4
PSC	58	4,0
Gesamt	1468	100,0

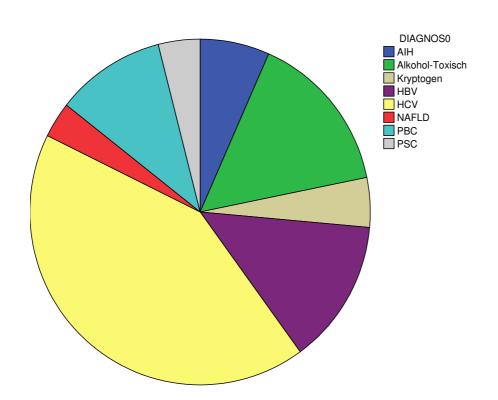


Abb. 8: Häufigkeiten der zugrundeliegenden Lebererkrankungen im Patientenkollektiv.

621 Patienten gehörten dem Hepatitis-C-Patientenkolllektiv an, hierbei waren 338 (54,4%) männlich, sowie 283 (45,6%) weiblich (siehe Tab. 11). Im Durchschnitt waren sie 51,17 Jahre alt (siehe Tab. 12). 505 (81,3%) der Patienten waren deutscher Herkunft, 41 (6,6%) türkischer und 49 (7,9%) anderweitiger europäischer Herkunft. 8 (1,3%) waren asiatischen, 14 (2,3%) arabischen und 4 (0,6%) afrikanischen Ursprungs (siehe Tab 13).

Tab. 11: Geschlechtsverteilung im Hepatitis-C-Patientenkollektiv.

Geschlecht	Anzahl n	Prozent %
Männlich	338	54,4
Weiblich	283	45,6
Gesamt	621	100,0

Tab. 12: Altersverteilung im Hepatitis-C-Patientenkollektiv

Altersmedian	Mittelwert	Anzahl n
Männlich	50,82	338
Weiblich	51,58	283
Insgesamt	51,17	621

Tab. 13: Ethnische Herkunft des Hepatitis C Patientenkollektivs.

Ethnische Herkunft	Anzahl n	Prozent %
Deutsche	505	81,3
Türken	41	6,6
Andere Europäer	49	7,9
Asiaten	8	1,3
Araber	14	2,3
Afrikaner	4	0,6
Gesamt	621	100,0

3.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 805 gesunden Neugeborenen, die im Jahr 1990 in der Frauenklinik der Charité Campus Virchow geboren wurden. Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern wurde ihnen Blut abgenommen und die DNA asserviert. Auch hierfür liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor.

3.1.3 Erfassung klinischer Daten

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte im April 2003 anhand von Krankenakten. Die Daten wurden in eine SPSS-Datei eingegeben. Erfasst wurden der Zeitpunkt der Erstvorstellung in der Poliklinik und die Erkrankungsdauer. Zu allen Patienten liegen allgemeine Daten, wie Alter, Geschlecht, Nationalität, Gewicht, Größe und Body-Mass-Index vor. Es wurden Begleiterkrankungen, Angaben zu einem möglichen HCC und einer Lebertransplantation erfasst. Weitere Daten sind Informationen zu Alkoholkonsum, Diabetes Mellitus, Familienanamnese, Medikamenteneinnahme, Toxineinwirkung, bei viralen Hepatitiden die Transmissionsart und bei autoimmunen Lebererkrankungen das Vorhandensein extrahepatischer Manifestationen. Laborchemisch erfasst wurden Transaminasen (TA), Parameter wie AP, γGT, Billirubin, Parameter zum Eisenhaushalt (Fe, Ferritin, Transferrin), Proteine (Albumin, Immunglobuline), Fette und bei den Autoimmunerkrankungen die Autoantikörper. Bei Patienten mit einer viralen Hepatitis

wurden zusätzlich Virusgenotyp, Virämie, und der Antikörperstatus erfasst. Die Laborwerte orientieren sich zeitlich an den Leberpunktionen, in den Fällen, in denen keine Leberpunktion durchgeführt wurde am Zeitpunkt der Erstvorstellung in der Lebersprechstunde. Die Laborwerte bei den lebertransplantierten Patienten sind zum Zeitpunkt der Routineuntersuchung vor der Transplantation bestimmt worden.

3.1.3.1 Schweregrad der Erkrankung (Fibrosestadien) bei Patienten mit Hepatitis C

Für die Berechnungen des Schweregrads der Erkrankung wurden aufgrund der umfassenderen Charakterisierung und vollständigeren Daten nur die Patienten mit chronischer Hepatitis C miteinbezogen. Patienten bei denen eine Koinfektion mit HBV/HIV bestand, oder bei denen keine Leberbiopsie durchgeführt wurde, wurden in die Untersuchung nicht mit einbezogen. Dementsprechend wurden 536 Patienten analysiert.

3.1.3.2 Leberbiopsien bei Patienten mit Hepatitis C

Zentraler Punkt für vorliegende Arbeit sind die Daten aus den Leberbiopsien, anhand derer bei insgesamt 535 der 621 Hepatitis-C-Patienten ein histologischer Fibrosegrad bestimmt werden konnte. Hierfür wurde die Klassifikation nach Scheuer benutzt (Fibrosestadium 1-4, 4 = Cirrhose). Erfasst wurden außer dem Fibrosestadium nach Scheuer die Entzündungsaktivität, das Vorhandensein von Gallengangsläsionen, das Vorhandensein einer Fettleber und der prozentuale Fettanteil. Zur Auswertung wurden zwei unterschiedliche Bewertungen benutzt. Bei der ersten steht das Fibrosestadium 0-1 für eine nicht vorhandene bis milde Fibrose und das Stadium 2-4 für eine relevante Fibrose. Bei der zweiten Betrachtungsart steht 0-2 für eine leichte und Stadium 3-4 für eine fortgeschrittene Fibrose. Bei dem Kollektiv der lebertransplantierten Patienten handelt es sich um die Histologien der Explantatleber.

3.1.3.3 Nicht invasive Fibrosebestimmung bei Patienten mit Hepatitis C

Eine nicht-invasive Bestimmung des Fibrosestadiums mittels Aspartate-Aminotransferase-to-Platelet Ratio Index (APRI Score) konnte bei 598 der 621 Patienten mit Hepatitis C erhoben werden. Der durch Wai et al. beschriebene Score wurde nach folgender Formel ermittelt: APRI = [Aspartat Aminotransferase in IU/L (/45) x 100] / [Thrombocytenzahl $(10^9 / L)$] [92]. Er korreliert signifikant mit dem histologisch nachgewiesenen Fibrosestadium. Als Grenzwerte wurden die von Wai et al. ermittelten "cut-off-

levels" benutzt. Es wurde bestimmt, wie viele Patienten keine Fibrose haben (absence of fibrosis bei Werten <0,5) und wie viele eine Fibrose haben (presence of fibrosis bei Werten >1,5). Für Patienten mit einem Index >0,5 und < 1,5 kann mit dem APRI score keine Aussage getroffen werden. Weiterhin wurde ermittelt, wie viele Patienten keine Cirrhose haben (Absence of cirrhosis bei Werten <1) und bei wie vielen ein Cirrhose vorliegt (Presence of cirrhosis bei Werten >2). Für Patienten mit einem Index zwischen >1 und <2 kann mit dem APRI score keine Aussage getroffen werden.

3.1.3.4 Therapien und Therapieansprechen bei Patienten mit Hepatitis C

Von den 621 Patienten mit chronischer Hepatitis C wurde bei 366 eine antivirale Therapie und das Ansprechen auf diese dokumentiert. Die diversen antiviralen Therapien wurden in 3 Grupppen zusammengefasst: 1. 102 Patienten (27,8%) erhielten eine Interferon-Monotherapie 2. 106 Patienten (29%) erhielten eine Interferon- und Ribavirintherapie 3. 153 Patienten (41,8%) erhielten eine Therapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin. Bei 5 Patienten (1,4%) fehlen die genaueren Angaben zur Therapie. (Siehe Tab. 14).

Tab. 14: Art der durchgeführten antiviralen Therapie bei den Hepatitis-C-Patienten.

Durchgeführten Therapie	Anzahl (n)	Prozent (%)
Interferon	102	27,8
Interferon + Ribavirin	106	29,0
Pegyliertes Interferon + Ribavirin	153	41,8
Fehlend	5	1,4
Gesamt	366	100,0

Das Therapieansprechen wurde wie folgt definiert:

- Sustained-Virologic-Response (SVR): negative HCV-RNA nach 24 Wochen Therapie, sowie 6 Monate nach Therapieende.
- Relapse (Rückfall): HCV-RNA negativ zum Therapieende, jedoch positiv in der 6 monatigen Nachbeobachtungszeit.

- Breakthrough: Rückfall unter Therapie.
- Non-Responder: Abfall der HCV-RNA um weniger als 2 log Stufen innerhalb von 12
 Wochen Therapie bzw. positives Ergebnis der HCV-RNA zur Therapiewoche 24
- Drop out: frühzeitiges Abbrechen der Therapie
- Ergebnis offen: Patienten, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung die Therapie noch nicht beendet hatten wurden nicht in die Auswertung zum Therapieansprechen eingeschlossen.

Von den 366 miteinbezogenen Patienten mit dokumentierter antiviraler Therapie, hatten 137 eine SVR, 64 einen Relapse, 18 einen Breakthrough und 147 waren Nonresponder. Weitere 25 Patienten mussten aufgrund eines frühzeitigen Therapieabbruchs oder aufgrund einer noch nicht abgeschlossenen Therapie (Ergebnis offen) von der Analyse ausgeschlossen werden (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Therapieansprechen der Hepatitis-C-Patienten auf antivirale Therapie.

Therapieansprechen	Anzahl n	Prozent (%)
SVR	137	35.0
Relapse	64	16.4
Breakthrough	18	4.6
Non responder	147	37.6
Drop out	19	4.9
Ergebnis offen	6	1.5

3.2 Material

3.2.1 Geräte

- Zentrifuge:
 Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipetten:
 - a) Eppendorf Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg

- **b)** Eppendorf Research Pipetten 0,5-10μl;10-100μl; 100-1000μl, Eppendorf AG, Hamburg
- c) Multichannel Finnpipette 5-50µl, Thermo Labsystems, Egelsbach
- d) Finnpipette 40-200µl Thermo Labsystems, Egelsbach
- PCR-Maschinen:
 - a) T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
 - b) Trio Thermpblock, Biometra GmbH, Göttingen
- Vortexer:

Minishaker MS1, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, U.S.A.

Probenerwärmer:

Dri Block DB3, model fdb030d, Techne, Cambridge

Light-Cycler:

Light-Cycler II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Kapillarzentrifuge:

LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

• LightCycler-Software:

Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

• PC:

Vectra, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn

Drucker:

Deskjet 970CXI, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn

• Bildschirm:

Vectra, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn

• SPSS-Software:

zur Erfassung klinischer Daten, zur Auswertung und Statistik

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Blutabnahmeröhrchen:

EDTA Monovetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

• DNA-Extraktionskit:

QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden

Reaktionsgefäße:

- a) Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg
- b) Qiagen Collection Tubes 15ml, Qiagen GmbH, Hilden
- c) Tubes 4ml 75x11,5mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Pipettenspitzen:

- a) Combitips plus 2,5ml u. 10ml, Eppendorf AG, Hamburg
- b) Eurotips in Racks 100μl u. 1000μl, Eppendorf AG, Hamburg
- c) 10µ, 100µl, 1000µl, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

PCR-Reaktionsgefäße:

PCR Tubes ultradünn 0,2ml Strips a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

• Light-Cycler-Kapillaren:

Capillaires, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

• Ethanol:

absolut (100%) Merck KgaA, Darmstadt

• Steriles Wasser:

Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen

PCR-Öl:

Bayol F, Serva, Heidelberg

3.2.4 Enzyme und zugehörige Puffer

• Taq-Polymerase:

5U/μl, AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Roche, Mannheim

• PCR-Puffer:

10x PCR-buffer, Applied Biosystems, Roche, Mannheim

MgCl₂:

15 nM, Applied Biosysthems, Roche, Mannheim

dNTPs:

je 2,5mM, Applied Biosystems, Roche, Mannheim

3.2.5 Primer und Sonden

PCR-Primer:

10 μM, TIBMOLBIOL, Berlin

Sonden:

5μM, TIBMOLBIOL, Berlin

3.2.6 Software

Light-Cycler Software, Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Version 14.0, Chicago, USA;

Microsoft Office, Microsoft Corporation, USA

Phase Version 2.1. Department of Statistics, University of Washington, Seattle, USA.

3.3 Methoden

3.3.1 Blutgewinnung und DNA Extraktion

Das Patientenblut wurde durch venöse Punktion gewonnen und in EDTA-Röhrchen bei -20 °Celsius gelagert. Zur DNA-Extraktion aus Vollblut wurde der QIAamp-DNA-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Gearbeitet wurde nach dem im Handbuch beschriebenen Protokoll für die DNA-Extraktion aus Vollblut. Aus praktischen Gründen wurde bei der Extraktion die vierfache Menge DNA extrahiert, d.h. es wurden pro Blutprobe 1600 μl verwendet, die in jeweils zwei Drehsäulen ("spin columns") extrahiert wurden.

3.3.2 PCR

Um die MBL-Polymorphismen bestimmen zu können, wurde die gewonnene genomische DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaktion = PCR) amplifiziert. Amplifiziert wurden die Abschnitte von Codon 1 bis 961 des Homo Sapiens (*MBL2-Gen* auf Chromosom 10). Verwendet wurden der MBL-Pr1-FA als Vorwärtsprimer und der MBL-E1b-RA als Rückprimer (siehe Tab. 16). Die Primer wurden von TibMolbiol Berlin synthetisiert.

Tab. 16: PCR-Primer 10 µM, TIBMOLBIOL, Berlin

Vorwärtsprimer MBL-Pr1-FA	CCTgC CAgAAAgTAg AgAgg
Rückprimer MBL-E1b-RA	gggCTgTTCT gTCTCTgCAA

3.3.2.1 Arbeitsablauf

Die genomische DNA wurde in PCR Strips à 8 Röhrchen (Biozym Diagnostik GmbH) pipettiert, jeweils 3 μ l pro Patient. Zu den 3 μ l DNA wurden jeweils 25 μ l PCR Mastermix hinzugegeben (siehe Tab 17) und ein Tropfen Öl zur Verhinderung der Evaporisation während des Amplifizierens.

Tab. 17: Zusammenstellung des Mastermixes für die PCR.

Mastermix für PCR	Mengen in μl für 1 Probe
H20	20,15
10 x Puffer	2,6
MgCl2	1,56
dNTP	1,0
Hinprimer	0,26
Rückprimer	0,26
Taq Polymerase	0,15
Insgesamt	26,04

Die Polymerase Kettenreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1. 95℃ für 12 Min
- 2. 95 °C für 20 Sek
- 3. 60 °C für 40 Sek
- 4. 72℃ für 90 Sek
- 5. 72℃ für 2 Min

Die Schritte 2-4 wurden 48-mal wiederholt, an den 48. Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt an. Nach einer Gesamtdauer von 3 ½ Stunden wurde die DNA bis zur Polymorphismusbestimmung im Kühlschrank bei +4° Celsius aufbewahrt.

3.3.3 Mutationsdetektion mittels Light-Cycler

3.3.3.1 Prinzip

Die MBL-Genotypisierung wurde mittels Light-Cycler durchgeführt. Es handelt sich um ein System mit zwei unterschiedlichen funktionellen Einheiten. Zum einen ein Thermocycler, in welchem die Amplifikation erfolgt, und zum anderen die Vorrichtung zur Fluoreszenzdetektion und -messung. Der Light-Cycler arbeitet mit 32 Proben gleichzei-

tig, die in Glaskapillaren à 20 µl pipettiert werden. Mit Hilfe von zwei Kanälen können zwei unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig bestimmt werden. Mit Hilfe von Oligonucleotidsonden und einer Schmelzkurvenanalyse ist es möglich eine Mutationsanalyse durchzuführen und Einzelbasenaustausche festzustellen. Dieser Ansatz der sequenzspezifischen Detektion mittels Hybridisierungssonden basiert auf dem FRET-Prinzip, dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Prinzip (siehe Abb. 9).

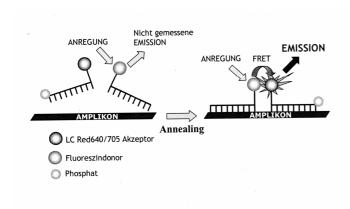


Abb. 9: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET-Prinzip) mit Hybridisierung und Anregung der Sonden (aus Light-Cycler-Manual, Roche).

Zur Reaktion benötigt man das zu analysierende PCR-Produkt und zwei Oligonucleotidsonden. Die erste Sonde, der Sensor, bindet mit dem 5' Abschnitt an die zu analysierende Region. An seinem eigenen 3' Abschnitt ist er an ein Fluorophor-Fluoreszin (FL) gebunden. Die zweite Sonde, der sogenannte Anker/Anchor ist mit seinem 5' Ende an den Farbstoff Light-Cycler-Red 640 oder 705 (LC) gekoppelt und bindet mit seiner 3' Region an die DNA. Binden nun beide Sonden an die genomische DNA, liegen sie eng nebeneinander und damit auch die Farbstoffe. Das FRET-Prinzip hängt von dieser räumlichen Nähe der beiden Farbstoffe ab, denn ohne diese Nähe kann kein Energietransfer stattfinden. Eine Leuchtdiode regt nun den Sensor an, welcher seine Energie an den Anchor weitergibt. Der angeregte Anchor emittiert daraufhin Licht einer anderen Frequenz, das vom Light-Cycler detektiert und gemessen werden kann. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Ablösung der Sonden von der DNA abnimmt, kann der Apparat durch Erhitzen auf 95°Celsius (zur Denaturierung), Abkühlen auf 45° Celsius und anschließender langsamer Erwärmung eine Schmelzkurve erstellen. Schon

beim Austausch einer einzigen Base bindet die Sonde nicht mehr so fest an die DNA, und die Schmelzkurve verschiebt sich nach links, da sich die Sonde bereits bei einer niedrigeren Temperatur von der DNA-Zielsequenz löst (siehe Abb. 10). Dies gilt für wildtypspezifische Sonden, bei mutationsspezifischen Sonden verhält es sich umgekehrt. Für die vorliegende Arbeit wurden mutationsspezifische Sonden benutzt.

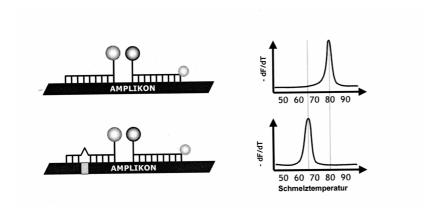


Abb. 10: Prinzip der Mutationsdetektion mit einer wildtypspezifischen Sonde. Durch den Austausch einer Base ist die Bindung von Sonde und Amplikon schwächer, die Schmelztemperatur wird niedriger (aus Light-Cycler-Manual, Roche).

3.3.3.2 Sonden

Zur Detektion der bekannten MBL-Varianten wurden 5 mutationsspezifische und 2 wildtypspezifische Sonden verwendet, anhand derer 5 verschiedene Punkmutationen auf dem *MBL-Gen* bestimmt wurden (Polymorphismen X/Y, P/Q, sowie 57, 54 und 52) (siehe Tab. 18).

Tab. 18: Light-Cycler-Sonden, welche bei der MBL-Polymorphismusdetektion verwendet wurden. Sen: *Sensor* = Donor, Anc: *Anchor;* Anker = Akzeptor, ph=Phosphat, FL=5,6-Carboxy-Fluoreszein.

MBL-Sen X/Y	TCTCACTgCCACCgAAAgCAT FL
MBL-Anc Y/X	LC705-TTTATAgTCTTCCAgCAgCAACgCCA ph
MBL-Sen P/Q	CAgAgggCATgCTCggTAA FL
MBL-Anc P/Q	LC705-ATgTgTTCATTACTgAgATTAACCTTCC-
	CTgAg ph
MBL-Sen G54D	LC640-CTCCCTTggTgTCATCACgCCCA ph
MBL-Sen G57E	LC640-TCTTCCTTggTgCCATCACgCCCA ph
MBL-Anc	CAgCCCAACACgTACCTggTTCCCCCT FL
52/54/57	

3.3.3.3 Durchführung

Zur Genotypisierung wurden je 6 µl PCR-Produkt in Light-Cycler-Kapillaren pipettiert, zu denen je 4 µl Sondenmix hinzugegeben wurden. Bei den Wiederholungsdurchgängen wurden jeweils 8 µl PCR-Produkt verwendet. Der Sondenmix wurde folgenderweise hergestellt (siehe Tab. 19):

Tab. 19: Zusammensetzung des Mastermixes für die Mutationsanalyse am Light-Cycler.

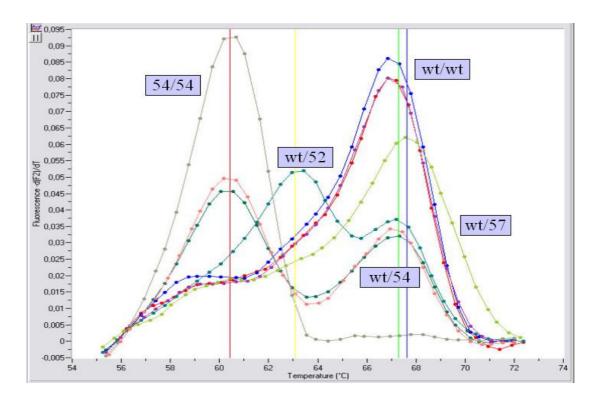
Mutation P/Q und 54 (B)	Mengen für 1 Probe in μΙ	Mutation X/Y und 57 (C)	Mengen für 1 Probe in μl
H2O	3,8	H2O	3,8
LC 54	0,18	LC 57	0,18
LC PQ	0,18	LC XY	0,27
FL 54	0,14	FL 57	0,14
FL PQ	0,14	FL XY	0,22

Für 15 Sekunden wurden die Proben bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend im Light-Cycler mit dem Programm "MBL-2-Melt" analysiert (siehe Tab. 20).

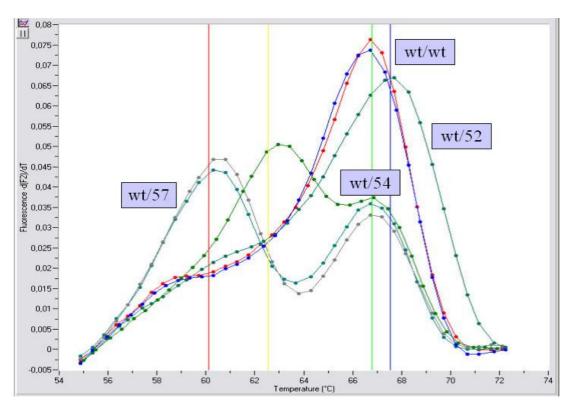
Tab. 20: Light-Cycler Messvorgang nach dem Programm MBL-2-Melt.

1.	95 °C für 60 Sekunden nach Temperaturanstieg von 20 °C/ s	Initiale Denaturierung
2.	45°C für 30 Sekunden nach Temperaturabfall	
	von 20 °C/ s	
3.	Temperaturanstieg von 0,1 °C/ s bis zu einer	Aufzeichnung der Fluoreszen-
	Temperatur von 80 ℃	zen zur Mutationsanalyse
4.	Abkühlung auf 40 ℃ mit 20 ℃/ s	

Als Ergebnis resultieren spezifische Schmelzkurvenmuster, aufgrund derer die Auswertung (die Zuordnung zu einem Genotyp) erfolgte (siehe Abb. 11-13).



Sensor: Polymorphismus 57



Sensor: Polymorphismus 52

Abb. 11: Spezifische Schmelzkurvenmuster zur Ermittlung der Polymorphismen im Exon 1 am Light-Cycler. Aufgrund der Spezifität der Sonden, resultiert bei Vorliegen des gesuchten Polymorphismus der jeweils höchste Schmelzpunkt.

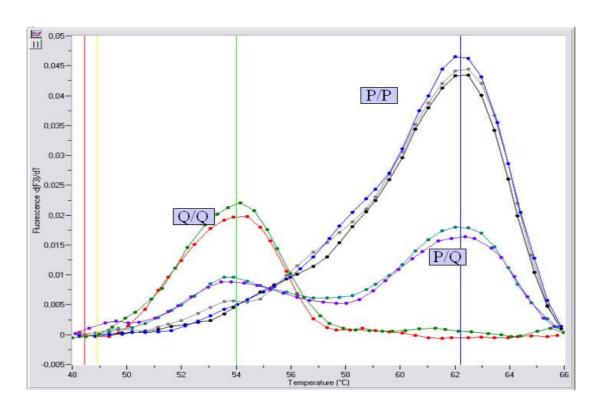


Abb. 12: Spezifische Schmelzkurvenmuster zur Ermittlung der PQ-Polymorphismen am Light-Cycler. Wildtypspezifische FRET-Sonde (Wildtyp=P). Aufgrund der hohen Spezifität der Sonden resultiert beim Vorliegen des P-Polymorphismus die höchste Schmelzkurve.

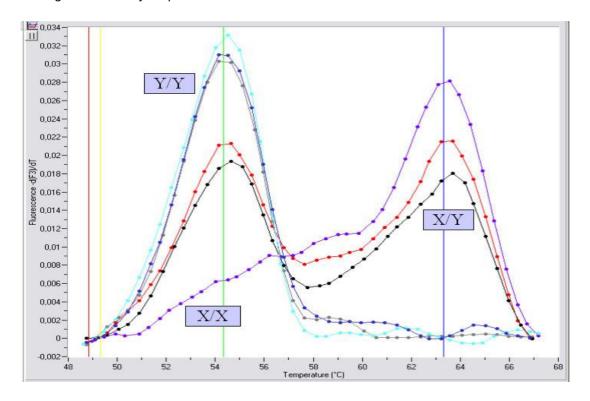


Abb. 13: Schmelzkurven für den Promoterpolymorphismus an Position -221 (Wildtyp= Y). Polymorphismusspezifische FRET- Sonde. Aufgrund der hohen Spezifität der Sonde resultiert bei Vorliegen eines Polymorphismus (X) die höchste Schmelzkurve.

3.3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) für Windows (Version 14.0).

Zur Berechnung der Allel- und Genotypvorkommen (erster Teil, siehe 4.1), sowie bei den Berechnungen zum Krankheitsschweregrad (zweiter Teil, siehe 4.2) wurde der Chi-Quadrat-Test benutzt. Die Ergebnisse wurden auf Signifikanzen geprüft, dabei wurden P-Werte unter 0,05 als signifikant betrachtet.

Für den dritten Teil der Berechnungen, nämlich der Analyse des Therapieansprechens (siehe 4.3), wurde zusätzlich eine binär logistische Regression durchgeführt.

Die Haplotypenanalysen erfolgten mit dem am Department of Statistics der University of Washington, Seattle, USA entwickelten Programm PHASE Version 2.1.1, mit den durch Stephens et al. beschriebenen Methoden der Haplotypenrekonstruktion [93, 94].

4 Ergebnisse

4.1 Allelfrequenzen und Genotypen

4.1.1 Allelfrequenzen der MBL-Varianten

Die Allelfrequenzen der Patienten mit chronischen Lebererkrankungen wurden mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Hierbei wurde weder bei den Exon-1-, noch bei den X/Y- Polymorphismen eine signifikante Differenz beobachtet (P-Werte bei Exon 1: 0,499, bei X/Y: 0,337, P/Q wurde in der Kontrollgruppe nicht untersucht) (siehe Tab. 21).

Um feststellen zu können, ob bestimmte Allele bei einzelnen Lebererkrankungen gehäuft oder vermindert auftreten, wurden die Allelfrequenzen außerdem in verschiedenen Diagnose-Untergruppen betrachtet.

Auch hierbei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden (P-Werte bei Exon 1: 0,620 bei P/Q: 0,135 und bei X/Y:0,565) (siehe Tab. 21).

Tab. 21: Frequenzen der Exon-1-, PQ-und XY-Allele bei den verschiedenen Erkrankungen und im Vergleich mit den Kontrollen.

Diagnosen		МВІ	Exon-1-Allel	e	
	Wt (A)	54 (B)	57 (C)	52 (D)	Gesamt
AIH	162 (83,5%)	18 (9,3%)	2 (1,0%)	12 (6,2%)	194 (100,0%)
Alkohol- Toxisch	335 (75,1%)	63 (14,1%)	7 (1,6%)	41 (9,2%)	446 (100,0%)
kryptogen	106 (77,9%)	18 (13,2%)	1 (0,7%)	11 (8,1%)	136 (100,0%)
HBV	311 (78,1%)	55 (13,8%)	7 (1,8%)	25 (6,3%)	398 (100,0%)
HCV	959 (77,2%)	168 (13,5%)	26 (2,1%)	89 (7,2%)	1242
NAFLD	77 (78,6%)	17 (17,3%)	1 (1,0%)	(3,1%)	98 (100,0%)
PBC	239 (78,1%)	40 (13,1%)	4 (1,3%)	23 (7,5%)	306 (100,0%)
PSC	97 (83,6%)	10 (8,6%)	0 (0,0%)	9 (7,8%)	116 (100,0%)
Gesamt	2286 (77,9%)	389 (13,2%)	48 (1,6%)	213 (7,3%)	2936 (100,0%)
Kontrollen	1252 (77,8%)	237 (14,7%)	27 (1,7%)	94 (5,8%)	1610 (100,0%)

Diagnose		PQ-Allel				
	Р	Q	Gesamt			
AIH	144	50	194			
	(74,2%)	(25,8%)	(100,0%)			
Alkohol-	356	90	446			
Toxisch	(79,8%)	(20,2%)	(100,0%)			
kryptogen	115	21	136			
	(84,6%)	(15,4%)	(100,0%)			
HBV	323	75	398			
	(81,2%)	(18,8%)	(100,0%)			
HCV	974	268	1242			
	(78,4%)	(21,6%)	(100,0%)			
NAFLD	69	29	98			
	(70,4%)	(29,6%)	(100,0%)			
PBC	238	68	306			
	(77,8%)	(22,2%)	(100,0%)			
PSC	91	25	116			
	(78,4%)	(21,6%)	(100,0%)			
Gesamt	2310	626	2936			
	(78,7%)	(21,3%)	(100,0%)			
Kontrollen	(0,0%)	0 (0,0%)	1610 (100,0%)			

Diagnass	XY-Allel				
Diagnose	Fehlend	x	Y	Gesamt	
AIH	0 (0,0%)	43 (22,2%)	151 (77,8%)	194 (100,0%)	
Alkohol-Toxisch	(0,4%)	86 (19,3%)	358 (80,3%)	446 (100,0%)	
kryptogen	(0,0%)	38 (27,9%)	98 (72,1%)	136 (100,0%)	
HBV	0 (0,0%)	95 (23,9%)	303 (76,1%)	398 (100,0%)	
HCV	(0,2%)	288 (23,2%)	952 (76,7%)	1242 (100,0%)	
NAFLD	(0,0%)	17 (17,3%)	81 (82,7%)	98 (100,0%)	
PBC	(0,0%)	65 (21,2%)	241 (78,8%)	306 (100,0%)	
PSC	(0,0%)	28 (24,1%)	88 (75,9%)	116 (100,0%)	
Gesamt	(0,1%)	660 (22,5%)	2272 (77,4%)	2936 (100,0%)	
Kontrollen	(0,0%)	376 (23,4%)	1234 (76,6%)	1610 (100,0%)	

4.1.2 Allelfrequenzen der MBL-Varianten bei unterschiedlichen Ethnien

Für die gesamte Patientenpopulation wurden die Allelfrequenzen der MBL-Polymorphismen untersucht. Die Frequenzen in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen wurden betrachtet und mit den aus der Literatur bekannten Allelfrequenzen (siehe Tab.4 Kapitel 1.2.3) verglichen.

Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung unserer Patienten-Population und Kontrollgruppe mit den bisher beschriebenen Allelfrequenzen bei Europäern. Die Ethnizität der Patienten hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Allelfrequenz (P-Wert Exon1: 0,107, PQ: 0,588 und XY: 0,49) (siehe Tab. 22).

Tab. 21: Frequenz der Exon-1, PQ- und XY-Allele bei den verschiedenen Ethnizitäten.

	Exon-1-Allele				
Ethnizität _	Α	В	С	D	Gesamt
Deutsche	1900	314	35	183	2432
	78,1%	12,9%	1,4%	7,5%	100,0%
Türken	154	35	4	17	210
	73,3%	16,7%	1,9%	8,1%	100,0%
Andere	138	32	3	11	184
Europäer	75,0%	17,4%	1,6%	6,0%	100,0%
Asiaten	45	5	2	0	52
	86,5%	9,6%	3,8%	0,0%	100,0%
Araber	38	2	4	2	46
	82,6%	4,3%	8,7%	4,3%	100,0%
Afrikaner	11	1	0	0	12
	91,7%	8,3%	0,0%	0,0%	100,0%
Gesamt	2286	389	48	213	2936
	77,9%	13,2%	1,6%	7,3%	100,0%

	PQ-Allel				
Ethnizität	Р	Q	Gesamt		
Doutoobo	1918	514	2432		
Deutsche	(78,9%)	(21,1%)	(100,0%)		
Today	176	34	210		
Türken	(83,8%)	(16,2%)	(100,0%)		
Andone	133	51	184		
Andere Europäer	(72,3%)	(27,7%)	(100,0%)		
	43	9	52		
Asiaten	(82,7%)	(17,3%)	(100,0%)		
	32	14	46		
Araber	(69,6%)	(30,4%)	(100,0%)		
Afrikaner	8	4	12		
Allikaliel	(66,7%)	(33,3%)	(100,0%)		
	2310	626	2936		
Gesamt	(78,7%)	(21,3%)	(100,0%)		

		XY-Allel			
Ethnizität	Х	Υ	Gesamt		
Doutocho	566	1862	2432		
Deutsche	(23,3%)	(76,6%)	(100,0%)		
T******	44	166	210		
Türken	(21,0%)	(79,0%)	(100,0%)		
Andere	36	148	184		
Europäer	(19,6%)	(80,4%)	(100,0%)		
	7	45	52		
Asiaten	(13,5%)	(86,5%)	(100,0%)		
	7	39	46		
Araber	(15,2%)	(84,8%)	(100,0%)		
Afrikaner	0	12	12		
Allinaliel	(0,0%)	(100,0%)	(100,0%)		
Gesamt	660	2272	2936		
Gesaiii	(22,5%)	(77,4%)	(100,0%)		

4.1.3 Genotypfrequenzen

Analog zu den Allelfrequenzen, wurden die Genotypfrequenzen der Patienten mit chronischen Lebererkrankungen mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Weiterhin wurden die Genotypfrequenzen der verschiedenen Diagnosegruppen untereinander verglichen. Für diese Betrachtungen wurden die Mutationen im Exon 1 auf folgende Weise zusammengefasst: Homozygote Wildtypen (AA), Heterozygote (A/B, A/C, A/D), Homozygote und compound Heterozygote (B/B, C/C, D/D, B/C, B/D, C/D).

Auch hier ist festzustellen, dass sich die Genotypfrequenzen weder bei den gesunden Kontrollen und den Patienten mit chronischen Lebererkrankungen insgesamt (P-Werte Exon 1: 0,409 und X/Y :0,634), noch in den einzelnen Diagnosegruppen signifikant unterscheiden (P-Werte Exon 1: 0,276, X/Y: 0,666 und PQ: 0,155) (siehe Tab. 23).

Tab. 22: Genotypfrequenzen der Exon-1-, PQ- und XY-Polymorphismen bei den verschiedenen Erkrankungen und im Vergleich mit Kontrollen.

		Exon-1-Genotyp			
Diagnose	Wildtyp	Heterozygot	Homozygote Mutation, Compound Heterocygot	Gesamt	
AlH	69 (71,1%)	24 (24,7%)	(4,1%)	97 (100,0%)	
Alkohol-Toxisch	127	81	15	223	
	(57,0%)	(36,3%)	(6,7%)	(100,0%)	
Kryptogen	39	28	1	68	
	(57,4%)	(41,2%)	(1,5%)	(100,0%)	
HBV	124	63	12	199	
	(62,3%)	(31,7%)	(6,0%)	(100,0%)	
HCV	377	205	39	621	
	(60,7%)	(33,0%)	(6,3%)	(100,0%)	
NAFLD	30 (61,2%)	17 (34,7%)	2 (4,1%)	49 (100,0%)	
PBC	90	59	4	153	
	(58,8%)	(38,6%)	(2,6%)	(100,0%)	
PSC	41 (70,7%)	15 (25,9%)	(3,4%)	58 (100,0%)	
Gesamt	897	492	79	1468	
	(61,1%)	(33,5%)	(5,4%)	(100,0%)	
Kontrollen	493	266	44	803	
	(61,4%)	(33,1%)	(5,5%)	(100,0%)	

Diagnose	PQ-Genotyp			
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	Gesamt
AIH	53	38	6	97
	(54,6%)	(39,2%)	(6,2%)	(100,0%)
Alkohol-Toxisch	144	68	11	223
	(64,6%)	(30,5%)	(4,9%)	(100,0%)
Kryptogen	50	15	3	68
	(73,5%)	(22,1%)	(4,4%)	(100,0%)
HBV	133	57	9	199
	(66,8%)	(28,6%)	(4,5%)	(100,0%)
HCV	383	208	30	621
	(61,7%)	(33,5%)	(4,8%)	(100,0%)
NAFLD	26	17	6	49
	(53,1%)	(34,7%)	(12,2%)	(100,0%)
PBC	90	58	5	153
	(58,8%)	(37,9%)	(3,3%)	(100,0%)
PSC	38	15	5	58
	(65,5%)	(25,9%)	(8,6%)	(100,0%)
Gesamt	917	476	75	1468
	(62,5%)	(32,4%)	(5,1%)	(100,0%)
Kontrollen	-	-		

Diagnose		XY-Genotyp			
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	Gesamt	
AIH	60	31	6	97	
	(61,9%)	(32,0%)	(6,2%)	(100,0%)	
Alkohol-Toxisch	143	72	7	223	
	(64,1%)	(32,3%)	(3,1%)	(100,0%)	
Kryptogen	36	26	6	68	
	(52,9%)	(38,2%)	(8,8%)	(100,0%)	
HBV	117	69	13	199	
	(58,8%)	(34,7%)	(6,5%)	(100,0%)	
HCV	358	236	26	621	
	(57,6%)	(38,0%)	(4,2%)	(100,0%)	
NAFLD	33	15	1	49	
	(67,3%)	(30,6%)	(2,0%)	(100,0%)	
PBC	91	59	3	153	
	(59,5%)	(38,6%)	(2,0%)	(100,0%)	
PSC	32	24	2	58	
	(55,2%)	(41,4%)	(3,4%)	(100,0%)	
Gesamt	870	532	64	1468	
	(59,3%)	(36,2%)	(4,4%)	(100,0%)	
Kontrollen	474	286	45	805	
	(58,9%)	(35,5%)	(5,6%)	(100,0%)	

4.1.4 Haplotypenanalyse

Bei der Betrachtung einzelner Polymorphismen kann auf mögliche Interaktionen zwischen den Polymorphismen keine Rücksicht genommen werden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Haplotypenanalyse durchgeführt. Bei der Haplotypenanalyse wurde die Haplotypenverteilung bei gesunden Kontrollen und Kranken betrachtet. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben sind aufgrund gestörter Kopplungsgleichgewichte sieben Haplotypen bekannt (HYPA mit hoher MBL-Konzentration, LYQA, LYPA und LXPA mit mittelgradig reduzierten MBL-Konzentrationen und LYPB, LYQC und HYPD ohne wirksames MBL) (siehe Tab. 3 in Kapitel 1.2.2).

Es wurde ein statistisch signifikantes, gehäuftes Vorkommen des YD-Haplotyps bei den

Patienten mit chronischen Lebererkrankungen beobachtet (0,0713 bei Patienten vs. 0,0564 bei Kontrollen, P-Wert 0,023) (siehe Tab. 24).

Tab. 23: Vergleich der Haplotypenfrequenzen von Patienten vs. Kontrollen.

	Erkrankte vs. Gesunde					
	Gesamt E	Gesamt SE	Gesunde Kontrollen E(0)	Gesunde Kontrollen SE (0)	Erkrankte E (1)	Erkrankte SE (1)
YA (high 100%)	0.555702	0.005705	0.553421	0.006171	0.556952	0.005537
XA (low 10%)	0.222719	0.005115	0.224407	0.005499	0.221794	0.005001
YC (0%)	0.015534	0.000698	0.014649	0.001214	0.016019	0.000506
YB (0%)	0.134355	0.003722	0.141759	0.004373	0.130296	0.003442
YD (0%)	0.066069	0.002105	0.056454	0.001922	0.071342	0.002281

E=Erwartungswert, SE=Standardabweichung

4.2 Bedeutung des MBL-Genotyps für die Schwere der Lebererkankung bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

4.2.1 MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom Fibrosestadium bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion

Bei 535 Patienten mit Hepatitis C, welche eine Leberbiopsie erhalten hatten, wurde das histologische Fibrosestadium bestimmt und mit dem Genotyp verglichen. 240 von ihnen hatten eine fortgeschrittene Fibrose, definiert als ein Fibrosestadium ab 3 nach Scheuer.

Ein hohes Fibrosestadium war nicht mit einem gehäuften Vorkommen von homozygoten oder heterozygoten Mutationen assoziiert (P-Werte für Fibrosegrad 0-2 vs. 3-4 Exon1: 0,672, P/Q: 0,283 und X/Y: 0,221) (siehe Tab. 25).

Tab. 24: Vergleich der Genotypen der Hepatitis-C-Patienten mit leichter bis mässiger versus fortgeschrittener Fibrose (Fibrosestadium 0-2 versus 3-4 nach Scheuer).

Leicht bis	Exon-1-Genotyp			
mässige versus. fortgeschrittene Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt
leichte/mässige Fibrose (0-2 n. Scheuer)	174 (54,5%)	98 (54,7%)	23 (62,2%)	295 (55,1%)
fortgeschrittene Fibrose (3-4 n. Scheuer)	145 (45,5%)	81 (45,3%)	14 (37,8%)	240 (44,9%)
Gesamt	319 (100,0%)	179 (100,0%)	37 (100,0%)	535 (100,0%)

Leicht bis mässige versus.	PQ-Genotyp			
fortgeschrittene Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
leichte/mässige Fibrose (0-2 n. Scheuer)	183 (54,5%)	102 (58,3%)	10 (41,7%)	295 (55,1%)
fortgeschrittene Fibrose (3-4 n. Scheuer)	153 (45,5%)	73 (41,7%)	14 (58,3%)	240 (44,9%)
Gesamt	336 (100,0%)	175 (100,0%)	24 (100,0%)	535 (100,0%)

Leicht bis mässige versus.		XY-Genotyp			
fortgeschrittene Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
leichte/mässige Fibrose (0-2 n. Scheuer)	181 (58,0%)	101 (50,2%)	12 (57,1%)	294 (55,1%)	
fortgeschrittene Fibrose (3-4 n. Scheuer)	131 (42,0%)	100 (49,8%)	9 (42,9%)	240 (44,9%)	
Gesamt	312 (100,0%)	201 (100,0%)	21 (100,0%)	534 (100,0%)	

Um zu sehen, ob ein Einfluss für besonders milde Formen der Erkrankung besteht, wurde die MBL2-Genotypenfrequenz zusätzlich bei Patienten mit fehlender bzw. minimaler Fibrose (Stadium 1 nach Scheuer) und solchen mit höhergradigen Fibrosestadien verglichen.

Auch in dieser Analyse konnte keine signifikante Assoziation zwischen Genotyp und Schwere der Erkrankung beobachtet werden (P-Werte für Fibrosegrad 0-1 vs. 2-4 Exon1: 0,198, P/Q: 0,412 und X/Y: 0,797) (siehe Tab. 26 und Abb. 14).

Tab. 25: Vergleich der Genotypen der Hepatitis-C-Patienten mit nicht relevanter versus relevanter Fibrose (Fibrosestadium 0-1 versus 2-4 nach Scheuer).

Nicht relevante	Exon-1-Genotyp				
Fibrose versus relevante Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt	
Nicht relevante	110	55	17	182	
Fibrose (St. 0-1 n.Scheuer)	(34,5%)	(30,7%)	(45,9%)	(34,0%)	
Relevante	209	124	20	353	
Fibrose (St. 2-4 n. Scheuer)	(65,5%)	(69,3%)	(54,1%)	(66,0%)	
Gesamt	319	179	37	535	
	(100,0%)	(100,0%)	(100%)	(100,0%)	

Nicht relevante Fibrose versus	versus			
relevante Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
Nicht relevante Fibrose (St. 0-1 n.Scheuer)	111 (33,0%)	65 (37,1%)	6 (25,0%)	182 (34,0%)
Relevante Fibrose (St. 2-4 n. Scheuer)	225 (67,0%)	110 (62,9%)	18 (75,0%)	353 (66,0%)
Gesamt	336 (100,0%)	175 (100,0%)	24 (100,0%)	535 (100,0%)

Nicht relevante Fibrose versus		XY-Genotyp			
relevante Fibrose	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
Nicht relevante Fibrose (St. 0-1 n.Scheuer)	108 (34,6%)	65 (32,3%)	8 (38,1%)	181 (33,9%)	
Relevante Fibrose (St. 2-4 n. Scheuer)	204 (65,4%)	136 (67,7%)	13 (61,9%)	353 (66,1%)	
Gesamt	312 (100,0%)	201 (100,0%)	21 (100,0%)	534 (100,0%)	

Auch hier wurden bei der Betrachtung der Genotypen die Mutationen im Exon 1 auf folgende Weise zusammengefasst: Homozygote Wildtypen (AA), Heterozygote (A/B, A/C, A/D), Homozygote und compound Heterozygote (B/B, C/C, D/D, B/C, B/D, C/D).

4.2.2 Haplotypenanalyse in Abhängigkeit vom Fibrosestadium bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

In der Haplotypenanalyse in Bezug auf eine relevante (F2-4) oder nicht relevante Fibrose (F0-1) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet (P-Wert: 0,34616).

4.2.3 MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom nicht-invasiven Fibrosescore APRI

In Ergänzung zum histologischen Fibrosegrad nach Scheuer wurde eine nicht invasive Abschätzung der Fibrose nach dem von Wai et al. beschriebenen APRI-score vorgenommen (siehe Kapitel 3.1.3.3). Hierbei wurden die von Wai et al. ermittelten "cut-offlevels" benutzt (absence of fibrosis bei Werten <0,5) (presence of fibrosis bei Werten >1,5).

Zwischen Patienten mit und ohne Fibrose wurden, in Bezug auf die MBL-Genotypfrequenzen, keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet (P-Werte Absence of Fibrosis Exon 1: 0,614, P/Q: 0,733 und X/Y 0,861) (P-Werte Presence of

Fibrosis Exon1: 0,656, P/Q: 0,193 und X/Y 0,966) (siehe Tab. 27).

Tab. 26: MBL-Genotypen der Hepatitis-C-Patienten in Bezug auf das Vorhanden sein / Nicht vorhanden sein einer Fibrose nach dem nichtinvasiven Fibrosescore APRI.

	Exon-1-Genotyp			
Fibrose klinisch nach APRI	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt
Absence of fibrosis	100	55	8	163
(<0.5)	(27,5%)	(28,1%)	(20,5%)	(27,3%)
Presence of	131	75	12	218
fibrosis (>1.5)	(36,1%)	(38,3%)	(30,8%)	(36,5%)
Ohne Aussage	132	66	19	217
(>0.5, <1.5)	(36,4%)	(33,6%)	(48,7%)	(36,2%)
Gesamt	363	196	39	598
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)

Fibrose klinisch nach APRI		PQ-Genotyp			
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
Absence of fibrosis	106	50	7	163	
(<0.5)	(28,3%)	(25,6%)	(24,1%)	(27,3%)	
Presence of	136	67	15	218	
fibrosis (>1.5)	(36,4%)	(34,4%)	(51,7%)	(36,5%)	
Ohne Aussage	132	78	7	217	
(>0.5, <1.5)	(35,3%)	(40,0%)	(24,2%)	(36,2%)	
Gesamt	374	195	29	598	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

Fibrose klinisch nach APRI	XY-Genotyp			
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
Absence of fibrosis (<0.5)	91 (26,5%)	63 (27,8%)	8 (30,8%)	162 (27,1%)
Presence of fibrosis (>1.5)	125 (36,3%)	84 (37,0%)	9 (34,6%)	218 (36,5%)
Ohne Aussage (>0.5, <1.5)	128 (37,2%)	80 (35,2%)	9 (34,6%)	217 (36,4%)
Gesamt	344 (100,0%)	227 (100,0%)	26 (100,0%)	597 (100,0%)

4.2.4 MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit histologisch gesicherter Lebercirrhose

Als weiterer Parameter für die Schwere der Lebererkrankung wurde das Vorhandensein einer histologisch gesicherten Cirrhose gewertet. Es wurde untersucht, ob Patienten mit Varianten des *MBL-Gens* überdurchschnittlich häufig eine Cirrhose entwickeln.

Weder bei den Polymorphismen im Exon 1 (P-Wert: 0,797) noch bei den P/Q- (P-Wert: 0,178) und X/Y-Polymorphismen (P-Wert: 0,473), konnte eine signifikante Differenz zwischen Patienten mit und ohne Cirrhose festgestellt werden (siehe Tab. 28 und Abb. 14).

Tab. 27: MBL-Genotypen bei Hepatitis-C-Patienten mit histologisch gesicherter Cirrhose versus histologisch gesichert keiner Cirrhose.

	Exon-1-Genotyp			
Cirrhose histologisch	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt
Keine Cirrhose	186	106	23	315
	(58,1%)	(58,2%)	(63,9%)	(58,6%)
Cirrhose	134	76	13	223
	(41,9%)	(41,8%)	(36,1%)	(41,4%)
Gesamt	320	182	36	538
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)

Cirrhose histologisch		PQ-Ge	enotyp	
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
Keine Cirrhose	194	110	11	315
	(57,6%)	(62,5%)	(44,0%)	(58,6%)
Cirrhose	143	66	14	223
	(42,4%)	(37,5%)	(56,0%)	(41,4%)
Gesamt	337	176	25	538
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)

Cirrhose histologisch		XY-Ge	notyp	
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
Keine Cirrhose	189	111	14	314
	(60,2%)	(55,2%)	(63,6%)	(58,5%)
Cirrhose	125	90	8	223
	(39,8%)	(44,8%)	(36,4%)	(41,5%)
Gesamt	314	201	22	537
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)

4.2.5 Haplotypenanalyse bei Patienten mit histologisch gesicherter Lebercirrhose

Bei der Betrachtung der Haplotypenverteilung in Bezug auf eine histologisch gesicherte Cirrhose wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (P-Wert: 0,99352).

4.2.6 MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit Lebercirrhose mit Hilfe des nicht-invasiven APRI-Scores

Analog zur Aussage über das Vorhandensein einer Fibrose mit Hilfe des nicht-invasiven APRI-Score, wurde auch eine Aussage über das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein einer Cirrhose getroffen (siehe Kapitel 3.1.3.3). Werte <1,0 machen das Vorhandensein einer Cirrhose unwahrscheinlich (absence of cirrhosis) und Werte >2,0 wurden mit dem Vorhandensein einer Cirrhose assoziiert (presence of cirrhosis).

Es ist festzustellen, dass es mit Ausnahme des P/Q-Polymorphismus zwischen den unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Vorkom-

men von MBL-Polymorphismen gibt. Beim P/Q-Polymorphismus zeigt sich eine grenzwertig signifikante Häufung von nicht MBL-produzierenden Q/Q-Genotypen (Presence of cirrhosis 8,3% vs. Rest von 4,8%) (P-Werte absence of cirrhosis für Exon1: 0,813, P/Q: 0,171, und für X/Y: 0,654) sowie (P-Werte presence of cirrhosis für Exon1: 0,997, P/Q: 0,045, und für X/Y: 0,569) (siehe Tab. 29).

Tab. 28: MBL-Genotypen der Hepatitis-C-Patienten in Bezug auf das Vorhanden-sein / Nicht-vorhanden-sein einer Cirrhose nach dem nicht invasiven Cirrhosescore APRI.

Cirrhose klinisch nach APRI		Exon-1-Genotypen			
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt	
Absence of cirrhosis (<1.0)	190 (52,3%)	97 (49,5%)	20(51,3%)	307 (51,3%)	
Presence of cirrhosis (>2,0)	103 (28,4%)	55 (28,1%)	11 (28,2%)	169 (28,3%)	
Ohne Aussage (>1,0, <2,0)	70 (19,3%)	44 (22,4%)	8 (20,5%)	122 (20,4%)	
Gesamt	363 (100,0%)	196 (100,0%)	39 (100,0%)	598 (100,0%)	

Cirrhose klinisch nach APRI		PQ-Genotyp			
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
Absence of cirrhosis (<1.0)	188 (50,3%)	108 (55,4%)	11 (37,9%)	307 (51,3%)	
Presence of cirrhosis (>2,0)	104 (27,8%)	51 (26,2%)	14 (48,3%)	169 (28,3%)	
Ohne Aussage (>1,0, <2,0)	82 (21.9%)	36 (18,4%)	4 (13,8%)	122 (20,4%)	
Gesamt	374 (100,0%)	195 (100,0%)	29 (100,0%)	598 (100%)	

Cirrhose klinisch nach APRI	XY-Genotyp			
	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt
Absence of cirrhosis (<1.0)	179 (52,0%)	112 (49,3%)	15 (57,7%)	306 (51,3%)
Presence of cirrhosis (>2,0)	98 (28,5%)	66 (29,1%)	5 (19,2%)	169 (28,3%)
Ohne Aussage (>1,0, <2,0)	67 (19,5%)	49 (21,6%)	6 (23,3%)	122 (20.4%)
Gesamt	344 (100%)	227 (100%)	26 (100%)	597 (100,0%)

4.2.7 MBL-Genotypfrequenzen bei Patienten mit Lebertransplantation

Von den 621 betrachteten Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion, wurden 155 aufgrund einer dekompensierten Lebercirrhose oder der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms lebertransplantiert. Eine durchgeführte Lebertransplantation wurde als Parameter für eine schwer verlaufende Erkrankung gewertet und demzufolge untersucht, ob Polymorphismen bei diesen Patienten häufiger auftreten.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Bei den lebertransplantierten Patienten traten weder heterozygote, noch homozygote Polymorphismen häufiger als bei Nichttransplantierten auf (P-Werte Exon 1: 0,880, P/Q: 0,805, X/Y: 0,804) (siehe Tab. 30 und Abb. 14).

Tab. 29: MBL-Genotypen bei lebertransplantierten Patienten mit chronischer Hepatitis C versus nicht lebertransplantierten Patienten mit chronischer Hepatitis C.

Leber-	Exon-1-Genotyp				
transplantation (LTX)	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt	
Keine LTX	283	155	28	466	
	(75,1%)	(75,6%)	(71,8%)	(75,0%)	
LTX	94	50	11	155	
	(24,9%)	(24,4%)	(28,2%)	(25,0%)	
Gesamt	377	205	39	621	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

Leber- transplantation		PQ Genotyp			
(LTX)	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
Keine LTX	288	157	21	466	
	(75,2%)	(75,5%)	(70,0%)	(75,0%)	
LTX	95	51	9	155	
	(24,8%)	(24,5%)	(30,0%)	(25.0%)	
Gesamt	383	208	30	621	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

Leber- transplantation		XY-Genotyp			
(LTX)	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
Keine LTX	272	174	19	465	
	(76,0%)	(73,7%)	(73,1%)	(75,0%)	
LTX	86	62	7	155	
	(24,0%)	(26,3%)	(26,9%)	(25,0%)	
Gesamt	358	236	26	620	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

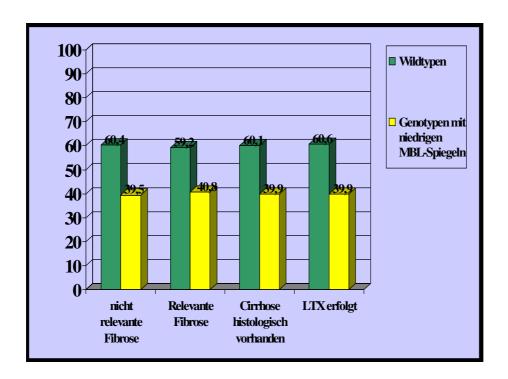


Abb. 14: Krankheitsprogression gemessen an Fibrose- und Cirrhoseentwicklung und erfolgter Lebertransplantation in Abhängigkeit von Exon-1-Genotypen mit hohen bzw. niedrigen MBL-Konzentrationen (nicht relevante Fibrose = Stadium 0-1 nach Scheuer, relevante Fibrose = Stadium 2-4 nach Scheuer).

4.3 Therapieansprechen bei Patienten mit Hepatitis C

4.3.1 MBL-Genotypfrequenzen in Abhängigkeit vom Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

Bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C wurde das Therapieansprechen auf eine antivirale Therapie mit Interferon/pegyliertem Interferon und Ribavirin in Bezug auf Genotypfrequenzen und Haplotypen betrachtet. Verglichen wurden Patienten mit dauerhaftem Ansprechen auf eine antivirale Therapie (Sustained-Virologic Response (SVR)) mit Patienten, bei denen kein dauerhaftes Ansprechen erreicht werden konnte (Non-Response, Relapse, Breakthrough).

In der Gruppe der Patienten mit gutem Therapieansprechen (SVR) wurde ein signifikant vermehrtes Vorkommen von Exon-1-Wildtypen mit hohen MBL-Spiegeln beobachtet (43,8% der Patienten mit Exon-1-Wildtypen vs. 28,2% der Patienten mit Mutationen im Exon 1) (P-Werte Genotypfrequenzen SVR vs. Nicht-SVR Exon 1: 0,009, P/Q: 0,204

und X/Y: 0,541) (siehe Tab. 31 und Abb. 15).

Tab. 30: Genotypen bei Hepatitis-C-Patienten mit einer Sustained-Virologic-Response (SVR) versus Patienten ohne SVR.

	Exon-1-Genotyp					
Sustained Responder vs. restliche	Wildtyp	Heterocygot	Homocygote Mutation, Compound Heterocygote	Gesamt		
SVR	95	36	6	137		
	(43,8%)	(29,3%)	(23,1%)	(37,4%)		
Nicht-SVR	122	87	20	229		
	(56,2%)	(70,7%)	(76,9%)	(62,6%)		
Gesamt	217	123	26	366		
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)		

Sustained Responder vs.	PQ-Genotyp				
restliche	Wildtyp Heterocygot Homocygot		Gesamt		
SVR	80	54	3	137	
	(34,9%)	(43,2%)	(25,0%)	(37,4%)	
Nicht-SVR	149	71	9	229	
	(65,1%)	(56,8%)	(75,0%)	(62,6%)	
Gesamt	229	125	12	366	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

Sustained Respon-	XY-Genotyp				
der vs. restliche	Wildtyp	Heterocygot	Homocygot	Gesamt	
SVR	81	48	8	137	
	(37,7%)	(35,8%)	(50%)	(37,5%)	
Nicht-SVR	134	86	8	228	
	(62,3%)	(64,2%)	(50%)	(62,5%)	
Gesamt	215	134	16	365	
	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	(100,0%)	

Durch eine multivariate Regressionsanalyse unter Einschluss von Alter, Geschlecht, HCV-Genotyp und γGT konnte der *MBL2*-Exon-1-Genotyp als unabhängiger Parameter

für das Therapieansprechen (SVR) bestätigt werden (OR: 0,545, 95% KI: 0,309-0,962, p: 0,036).

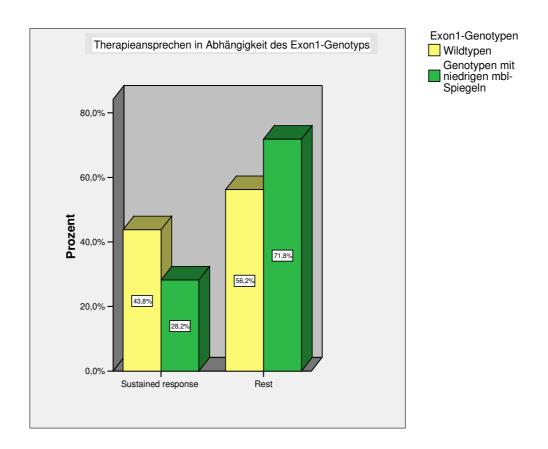


Abb. 15: Therapieansprechen (Patienten mit Sustained-Response (SVR) versus Restliche) in Abhängigkeit des Exon-1-Genotypes (Genotypen mit hohen MBL-Spiegeln versus Genotypen mit niedrigen MBL-Konzentrationen).

4.3.2 Haplotypenanalyse in Abhängigkeit vom Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

Untersucht wurde die Haplotypenverteilung in Bezug auf das Therapieansprechen (Erreichen einer SVR versus Restliche).

Beobachtet werden konnte ein erhöhtes Vorkommen an MBL-produzierenden Haplotypen (YQA, YPA) bei den Sustained-Respondern, sowie ein erhöhtes Vorkommen von nicht MBL-produzierenden Haplotypen (YQC, YPB, YPD) bei den Patienten, die keine SVR erreichten. Im Gegensatz zu der Genotypenanalyse waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant (P-Wert: 0,3184) (Siehe Tab. 32 und Abb. 17).

Tab. 31: Haplotypen bei Patienten mit Hepatitis C in Abhängigkeit des Therapieansprechens (Sustained-Virological-Response (SVR) vs. Nicht-SVR).

SVR vs. Nicht-SVR						
	Gesamt E	Gesamt SE	SVR E (0)	SVR SE (0)	Nicht-SVR E (1)	Nicht-SVR SE (1)
YQA (high 100%)	0.184044	0.001033	0.203726	0.001864	0.172271	0.001200
YPA (high/interm)	0.354954	0.001572	0.387260	0.001535	0.335625	0.002311
XPA (low 10%)	0.226462	0.001345	0.233249	0.001241	0.222402	0.001809
YQC (0%)	0.019167	0.000796	0.014853	0.001277	0.021747	0.000993
YPB (0%)	0.141070	0.000783	0.116607	0.000825	0.155707	0.001215
YPD (0%)	0.072322	0.000341	0.043723	0.000509	0.089432	0.000428

E=Erwartungswert, SE= Standardabweichung

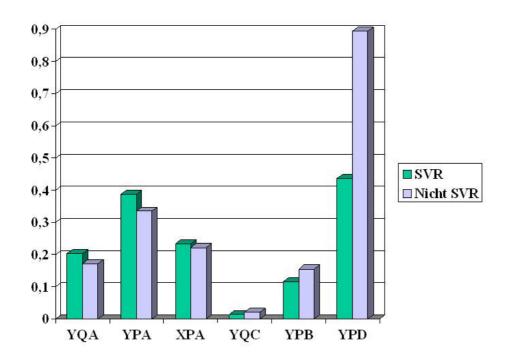


Abb. 16: MBL-Haplotypen in Abhängigkeit des Therapieansprechens (SVR vs. Nicht-SVR).

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Polymorphismen im *MBL-Gen* bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen gehäuft auftreten, ob bei Patienten mit *MBL* Polymorphismen eine schnellere Fibroseprogression festzustellen ist und ob bei Hepatitis-C-Patienten mit MBL-Polymorphismen ein schlechteres Therapieansprechen zu beobachten ist. Es wurden insbesondere die MBL-Polymorphismen untersucht, die mit einer verminderten MBL-Serumkonzentration assoziiert sind. Um bei ausreichender statistischer Power zu konsequenten Schlussfolgerungen kommen zu können, wurden 1468 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen sowie 805 Kontrollpersonen eingeschlossen.

5.1 Allelfrequenzen, Genotypen und Haplotypen

Die Allel- und Genotypfrequenzen der *MBL*-Polymorphismen der Patienten dieser Untersuchung stimmen mit den aus der Literatur bekannten Frequenzen für Europäer überein. In der durchgeführten Haplotypenanalyse wurde eine signifikante Häufung des mit niedrigen MBL-Spiegeln einhergehenden YD-Haplotyps bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen beobachtet (YD-Haplotyp: Kontrollen: 0,713 vs. Kranke: 0,564, p=0,023).

Wie in den Arbeiten von Thomas [78], Bellamy [79] und Yuen [81] vorbeschrieben, ließ sich auch in unserer Patientenpopulation keine Assoziation von MBL-Polymorphismen im Codon 57 mit dem Vorliegen einer chronischen Virushepatitis nachweisen. Darüber hinaus zeigt unsere Untersuchung auch für andere Lebererkrankungen, für die es bisher in der Literatur keine Untersuchungen gibt, keine Assoziation mit MBL-Polymorphismen in Codon 57. Bei der Untersuchung von MBL-Polymorphismen in Codon 52 wurde bisher in einer Studie bei Europäern eine positive Assoziation mit dem Vorliegen einer chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion beobachtet [78]. Dieses Ergebnis konnte jedoch in drei nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden [26, 80, 81]. Auch in unseren Untersuchungen konnten wir keine Assoziation von Polymorphismen in Codon 52 mit chronischer Hepatitis B oder anderen Lebererkrankungen zeigen. Eine

Erklärung für die positive Assoziation bei Thomas et al. könnte die niedrige Patientenzahl von 19 und 33 Patienten sein, die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Die Ethnizität der Patienten als Grund für unterschiedliche Ergebnisse scheint in diesem Falle von untergeordneter Bedeutung, da sowohl in der Studie von Hoehler et al. als auch in der vorliegende Studie Patienten europäischer Herkunft untersucht wurden. Am ausführlichsten von den MBL-Exon-1-Polymorphismen wurde bis dato der Einfluss des Codon 54 untersucht. Jedoch konnte in keiner der Untersuchungen in Populationen verschiedener Ethnizität eine Assoziation von Polymorphismen im Codon 54 mit chronischer Virushepatits B oder C nachgewiesen werden [78-81, 83, 84, 88, 90]. Song et al. berichteten lediglich über ein signifikant erhöhtes Vorkommen des Codon-54-Polymorphismus bei alleiniger Betrachtung der Patienten mit akuter HBV-Infektion [26]. In einer kleinen Gruppe von 43 Patienten mit fulminantem Leberversagen fand man jedoch kein gehäuftes Auftreten von Codon 54 Polymorphismen [82]. Unsere Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der vorangegangenen Studien, da auch sie kein vermehrtes Auftreten des Polymorphismus im Codon 54 bei HBV- und HCV- infizierten Patienten zeigen. Patienten mit akutem Leberversagen oder akuter Hepatitis B wurden in der vorliegenden Studie aufgrund der geringen Patientenzahlen nicht gesondert betrachtet. Weitaus weniger untersucht wurden bisher das Vorkommen der X/Y-, H/Lund P/Q-Polymorphismen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Chong et al. [84] untersuchten die Frequenz des X/Y-Polymorphismus bei HBV-Infizierten und stellten keine Assoziation fest. Hakozaky et al. [82] untersuchten 43 japanische Patienten mit fulminantem Leberversagen, konnten jedoch auch hier kein vermehrtes Auftreten des X/Y- oder ein vermindertes Auftreten des H/L-Polymorphismus beobachten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen in die gleiche Richtung, da auch hier keine erhöhten Allelfrequenzen der X/Y- und P/Q-Polymorphismen bei keiner der untersuchten Erkrankungen beobachtet werden konnte.

Bei genetischen Analysen ist die Berücksichtigung der Ethnizität der untersuchten Patientengruppen von entscheidender Bedeutung. So kommen beispielweise Polymorphismen im Codon 52 und 57 bei asiatischen Menschen kaum vor. Polymorphismen im Codon 54 sind sowohl bei Europäern als auch bei Asiaten relativ häufig, während sie bei Afrikanern äußerst selten zu finden sind. Bei Afrikanern hingegen, ist der Polymorphismus im Codon 57 häufiger zu finden. Um beispielsweise den Einfluss von *MBL*-Polymorphismen an einer asiatischen Population zu untersuchen und um eine valide

Aussage treffen zu können, sind wesentlich größere Patienten- und Kontrollpopulationen notwendig, da insbesondere die Polymorphismen im Codon 52 und 54 wesentlich seltener vorkommen. Insofern muss man sich kritisch fragen, ob die Patientenzahlen trotz der großen Gruppen untersuchter Patienten in unserer Studie ausreichend sind, um eine valide Aussage über den Polymorphismus im Codon 57 zu treffen. Er ist bei Europäern mit einer Allelfrequenz von 0,01 bis 0,02 vertreten. Bei 1468 Untersuchten bzw. 2936 Allelen ergibt das 29,36 bis 58,72 Allele mit der Punktmutation im Codon 57. Insbesondere bei der Betrachtung von Subpopulationen ist die statistische Power der Untersuchungen weiter eingeschränkt. Im Vergleich mit publizierten Studien sind die Untergruppenzahlen unserer Arbeit dennoch relativ hoch, insbesondere in Bezug auf wichtige Erkrankungen wie Hepatitis C und B sowie PBC und PSC. Dieses Beispiel verdeutlicht die Problematik, dass man, um eine statistisch relevante Aussage zu treffen, ausreichend hohe Patientenzahlen benötigt. Mit 1468 untersuchten Patienten wird dieser Forderung vergleichsweise gut Rechnung getragen.

Eine Stärke unserer Studie ist die Tatsache, dass mit Ausnahme des H/L-Polymorphismus, alle MBL-Polymorphismen untersucht wurden, für die eine relevante funktionelle Bedeutung gezeigt wurde. Dies ist mit Hinblick auf Interaktionen zwischen den einzelnen Polymorphismen von Bedeutung und kann bei Betrachtung einzelner Polymorphismen nicht berücksichtigt werden. Diese Interaktionen werden in einer Haplotypenanalyse abgebildet. Die Haplotypenanalyse zeigte einen signifikanten Unterschied bei der Verteilung des YD-Haplotyps zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit chronischen Lebererkrankungen (YD-Haplotyp: Kranke: 0,713 vs. gesunde Kontrollen: 0,564, p=0,023). Dieses grenzwertig signifikante Ergebnis ist jedoch von eingeschränkter Aussagekraft, da es sich bei den Patienten mit chronischen Lebererkrankungen um eine heterogene Gruppe handelt und auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet wurde.

5.2 Schweregrad bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

Eine wesentliche Fragestellung der Arbeit war es zu untersuchen, ob das Vorliegen von MBL-Polymorphismen einen Einfluss auf den Verlauf der Lebererkrankung hat. Hierfür

wurde die Subgruppe der chronisch Hepatitis-C-infizierten-Patienten ausgewählt, da die meisten Untersuchungen in der Literatur zur Assoziation der Fibroseprogression mit genetischen Alterationen mit Hepatitis-C infizierten Patienten durchgeführt wurden. Der Verlauf der Erkrankung wurde anhand des Fibrosegrades in der Leberbiopsie, der Entwicklung einer Lebercirrhose und der Notwendigkeit einer Lebertransplantation charakterisiert. Es konnte jedoch keine Assoziation der MBL-Polymorphismen mit diesen klinischen Parametern gezeigt werden.

Zur Fragestellung der Assoziation von MBL-Polymorphismen mit dem Schweregrad bei chronischer Hepatitis C existieren bis dato nur wenige Studien. Sasaki et al. beschrieben in einer kleinen Population von 52 HCV-infizierten Patienten eine schnellere Krankheitsprogression bei B-Allelträgern (gemessen in Form von Entwicklung einer chronisch aktiven Hepatitis bzw. einer Lebercirrhose) [88]. Von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist auch eine Studie von Kilpatrick [89] an 180 europäischen HCV-Infizierten Patienten. Sie unterscheidet sich von vorliegender Studie insofern, als dass sie MBL-Konzentrationen misst und keine Allel- oder Genotypfrequenzen bestimmt wurden. In Bezug auf die Krankheitsprogression kommt auch sie zu dem Schluss, dass die MBL-Konzentration keinen Einfluss hat. Eine Zuordnung zu den beiden bereits existierenden Studien ist aufgrund der einerseits sehr niedrigen Fallzahlen und der unterschiedlichen Ethnizität bei Sasaki, sowie der anderen Methodik (MBL-Konzentrationsmessung) bei Kilpatrick nur eingeschränkt möglich. Jedoch deuten unsere Ergebnisse wie die Untersuchungen von Kilpatrick daraufhin, dass MBL für die Entwicklung einer fortgeschrittenen Fibrose bei chronischer Hepatitis C von untergeordneter Bedeutung ist.

Um den Schweregrad der Erkrankung zu bestimmen gibt es unterschiedliche Ansätze. In dieser Studie wurde neben dem histologischen Schweregrad auch der nicht-invasive APRI-Fibrosescore für die Analysen verwendet. Darüber hinaus wurde die Entwicklung einer Lebercirrhose und die Notwendigkeit einer Lebertransplantation als Parameter für den Schweregrad und somit für eine progrediente Erkrankung gewertet. Limitationen all dieser Untersuchungsmethoden sind, dass es sich dabei um Querschnitt-untersuchungen handelt, die Aussagen zur Krankheitsprogression nur eingeschränkt zulassen. Diese Einschränkungen gelten jedoch ebenfalls für den größten Teil der bisher publizierten genetischen Studien zur chronischen Hepatitis C. Andererseits

würde man bei einer biologisch relevanten genetischen Sequenzalteration eine Überrepräsentation bei den besonders schwer erkrankten Patienten erwarten, wie sie z. B. die Patienten mit Lebercirrhose und/oder Lebertransplantation darstellen. Um die Aussagekraft zu erhöhen, ist es sinnvoll multivariate Analysen durchzuführen, in denen Faktoren, die Einfluss auf die Fibroseprogression haben wie beispielsweise Alter und Geschlecht, als Kofaktor verwendet werden. Durch eine multivariate Regressionanalyse bei der Betrachtung des Therapieansprechens in Assoziation mit den untersuchten MBL-Polymorphismen wurde versucht diesen Einflüssen Rechnung zu tragen.

Die Leberpunktionen bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden grundsätzlich vor Beginn einer antiviralen Therapie durchgeführt. Die Leberbiopsie ist nach wie vor der Goldstandard zur Bestimmung des Fibrosegrades. Jedoch weist auch diese Methode einige Schwachstellen auf. Zum einem gibt es den sogenannten Sampling Error, da die Fibrosebildung in der Leber nicht homogen verteilt ist und die Leberpunktion nur einen kleinen Teil der gesamten Leberveränderungen erfasst. Zum anderen kann die Begutachtung zwischen verschiedenen Pathologen variieren. Desweiteren ist eine Leberpunktion ein invasiver Eingriff, der einer sorgfältigen Indikationsstellung bedarf. Somit liegen nicht von allen Patienten Histologieergebnisse vor. Zur sicheren Bestimmung der Fibroseprogression wären multiple Leberbiopsien bei einem Patienten in Zeitabständen nötig, was jedoch im klinischen Alltag wenig praktikabel ist [8]. Insofern gewinnen zunehmend nicht-invasive Tests zur Fibrosebestimmung an Attraktivität um die Fibroseprogression prospektiv zu betrachten. Die Einschätzung einer Fibrose nach dem APRI-Score ist eine neue Methode, die aus verschiedenen Gründen sinnvoll erscheint. Sie umgeht die problematischen Seiten der Leberbiopsie, da diese Methode leicht durchzuführen, nicht invasiv, preiswert ist und nicht den interindividuellen Einflüssen der Pathologen oder der Qualität des Biopsates unterliegt. Man kann mit dieser Methode jedoch nie eine Aussage über alle Patienten treffen, sondern immer nur über einen gewissen Prozentsatz, der über oder unter einem bestimmten "cut-off-level" liegt.

5.3 Therapieansprechen bei Patienten mit Hepatitis C

Eine weitere zentrale Fragestellung der Arbeit war es zu untersuchen, ob Hepatitis-C-Patienten mit MBL-Polymorphismen schlechter auf eine antivirale Therapie mit Interferon/pegyliertem Interferon und Ribavirin ansprechen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MBL-Exon-1-Polymorphismen (Codon 52, 54, 57) signifikant seltener ein dauerhaftes virologischen Ansprechen (SVR) erreichten als Patienten mit Wildtyp-MBL. Bei den Patienten, die eine SVR erreichten, fanden sich signifikat häufiger die MBL-Varianten mit hohen MBL-Spiegeln (43,8% der Patienten mit Exon-1-Wildtypen vs. 28,2% der Patienten mit Mutationen im Exon 1, p=0,009).

In Bezug auf das Therapieansprechen bei Trägern von MBL-Polymorphismen gibt es bereits einige Veröffentlichungen in kleineren Patientenpopulationen, welche mit Ausnahme einer Studie, welche auf MBL-Konzentrationsmessungen basiert [43], auf einen relevanten Einfluss hinweisen [86-88]. Kilpatrick et al. fanden bei Messung der MBL-Konzentration bei 180 europäischen HCV-Infizierten, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede bei den "Respondern" und "Non Respondern". [89]. Wie in 5.2 schon erwähnt ist es schwierig die Arbeit von Kilpatrick mit den anderen zu vergleichen, da Kilpatrick nicht den Weg der Genotypenbestimmung, sondern den der MBL-Konzentrationsmessung gewählt hat, die abhängig vom Aktivierungsgrad und somit vom Messzeitpunkt ist. Da MBL ein Cytokin ist, ist seine Konzentration außerdem bei Erkrankten im Rahmen der Immunantwort erhöht. Der Einfluss einer Interferontherapie auf die MBL-Konzentrationen wurde bisher nicht untersucht, ist aber sicherlich nicht zu vernachlässigen. Eine Korrelation der MBL-Konzentrationen mit den Genotypfrequenzen in der Arbeit von Kilpatrick wäre interessant, liegt jedoch nicht vor. Zum Mechanismus, der den Einfluss auf das Therapieansprechen ausmacht, gibt es bisher nur Hypothesen. Matsushita selbst erklärt seine Ergebnisse mit einer möglichen direkten Interaktion zwischen MBL und HCV-RNA. Seiner Meinung nach könnte MBL dazu beitragen, die durch eine Interferon-Therapie supprimierte HCV-RNA komplett zu eliminieren. Eine Schwäche der Studie von Matsushita ist auch hier die Patientenzahl. so kommt es zu einer Untergruppe von einem einzigen Patienten der homozygot für den Polymorphismus im Codon 54 ist und einen Therapieerfolg zeigt (SVR).

Das Ergebnis unserer Untersuchungen steht im Einklang mit den bereits veröffentlichten Resultaten. Während in der Untersuchung von Matsushita lediglich Patienten

eingeschlossen wurden, die eine Interferon Monotherapie erhalten hatten, wurden in unsere Studie auch Patienten eingeschlossen, die eine Kombinationstherapie mit Ribavirin, z. T. mit pegyliertem Interferon erhalten hatten. Zu beachten ist weiterhin, dass die Aussagen auch bei unserer relativ großen Studie durch die Untergruppen schlussendlich auf relativ kleinen Fallzahlen basieren (6 und 36 Patienten mit SVR mit homocygoten bzw. compound heterocygoten Mutationen). Die weiterhin durchgeführte multivariate Regressionsanalyse unter Einschluss von Alter, Geschlecht, HCV-Genotyp und yGT stützt jedoch die Aussage, dass es sich bei den Exon-1-Polymorphismen um unabhängige Parameter für das Therapieansprechen handelt. In jedem Fall muss dieses Ergebnis in einem erweiterten Patientenkollektiv validiert werden um zu einer endgültigen Schlussfolgerung zu kommen. Die Haplotypenanalyse stützt die Beobachtung insofern, als dass auch sie einen Trend zeigt, dass bei Haplotypen mit niedrigerer MBL-Konzentration die Wahrscheinlichkeit einer SVR niedriger ist. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant und muss ebenfalls in größeren Patientenpopulationen überprüft werden.

5.4 Besondere Aspekte einzelner Lebererkrankungen

Das Spektrum an Lebererkrankungen, die in dieser Arbeit untersucht wurden ist groß und die pathophysiologischen Prozesse, die eine Rolle spielen, sind, trotz des gemeinsamen Endpunktes Leberfibrose, vielfältig.

Bei den viralen Hepatitiden steht die Virusabwehr im Vordergrund. Eine unvollständige Eliminierung des Virus führt zu einer chronischen Entzündung und zur Entwicklung von Leberfibrose. Zur Eliminierung des Virus braucht der Organismus ein funktionsfähiges Immunsystem, wozu auch ein gut induzierbares Komplementsystem gehört. Zwischen Virus und MBL scheint es außerdem zu direkten Interaktionen zu kommen. Auf der anderen Seite führt bekanntlich nicht das Virus an sich, sondern die durch es ausgelöste Immunreaktion des Wirtes zur Leberschädigung. Demzufolge könnte ein intaktes Immunsystem mit gut induzierbarem Komplementsystem im Versuch ein Hepatitisvirus zu eliminieren durch eine starke Immunreaktion eher zu einer Schädigung der Leber führen. Diese Überlegungen werden durch den unter anderem von Garred et al.

postulierten Überlebensvorteil von Menschen mit heterozygoten MBL-Genotypen gestützt. Wie schon in der Einleitung (1.2.3.) beschrieben, stellen niedrige MBL-Konzentrationen dieser These zufolge durch eine abgeschwächte, aber dennoch funktionsfähige Komplementaktivierung einen Schutz vor Entzündung und dazugehöriger Gewebeschädigung, dar [52, 53]. Diese zwei unterschiedlichen Aspekte eines niedrigen MBL-Spiegels müssen auch bei dieser Arbeit in Betracht gezogen werden. Sie könnten eine Erklärung für die Negativergebnisse in Bezug auf die Erkrankungsschwere einerseits und für die Positivergebnisse in Bezug auf das Therapieansprechen andererseits sein.

In Bezug auf die Leber betreffende Autoimmunerkrankungen, gibt es bis Dato weniger Untersuchungen. Matsushita beobachtete erhöhte MBL-Konzentrationen bei PBC-Patienten. Dieses Phänomen lässt sich parallel zu den oben beschriebenen Prozessen erklären, demzufolge eine starke Immunantwort durch eine starke Entzündungsreaktion eine starke Gewebeschädigung hervorruft. Man könnte daraus schließen, dass sich die Mutationen im *MBL-Gen* protektiv auf das Auftreten von PBC auswirken [90]. Erklären kann man sich dieses Phänomen allerdings auch durch die Freisetzung von MBL als Akute-Phase-Protein im Rahmen der Entzündung. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation von MBL-Genotypen mit hohen MBL-Konzentrationen zu autoimmunen Lebererkrankungen beobachtet werden. Es wäre allerdings interessant, auch bei dieser Patientengruppe die Erkrankungsschwere in Bezug auf den MBL-Genotyp zu untersuchen. Für diese Untersuchungen ist jedoch unser Patientenkollektiv nur eingeschränkt geeignet, da die Untergruppen bezüglich der verschiedenen Fibrosegrade bei diesen Erkrankungen zu klein wären.

5.5 Problematik genetischer Studien, methodische Aspekte

5.5.1 Grundsätzliche Aspekte

Da nicht nur der Genotyp die MBL-Konzentration beeinflusst, ist eine Schlussfolgerung vom Genotyp auf den Phänotyp nur eingeschränkt möglich. Die große Schwankungsbreite der MBL-Serumkonzentration in Individuen mit dem gleichen Genotyp schränkt die Wertigkeit des Genotyps als alleinigen Parameter für die MBL-Konzentration ein.

Auf der anderen Seite wird der Genotyp nicht wie die MBL-Konzentration von Krankheit und Immunantwort beeinflusst [43]. Wie bereits erwähnt, ist es bei der Untersuchung eines Genes wichtig, dessen pathophysiologische Funktion zu kennen. Unser biologisches System unterliegt in vielen Bereichen einer gewissen Redundanz, und eine Punktmutation und deren funktioneller Effekt müssen nicht unbedingt auch eine biologische Konsequenz nach sich ziehen [95]. Der Genotyp kann keinen Zusammenhang zwischen MBL-Konzentration und Krankheit beweisen. Die beobachteten klinischen Einflüsse von Polymorphismen im *MBL2-Gen* könnten somit theoretisch auch über ein anderes Kandidatengen, welches mit dem *MBL2-Gen* im Kopplungsgleichgewicht steht, vermittelt werden [96]. Anzumerken ist, dass für die MBL-Polymorphismen und für die MBL-Konzentrationen sehr gute funktionelle Daten vorhanden sind (siehe Einleitung Punkt 1.2), die es rechtfertigen, in dieser Studie von den Polymorphismen im *MBL-Gen* auf die MBL-Konzentration im Blut zu schließen.

Eine weitere Hypothese zur Rolle der MBL-Defizienz ist, dass diese nur in Kombination mit einer weiteren Immundefizienz eine Rolle spielt. Für diese These spricht, dass die meisten Personen mit niedrigen und sehr niedrigen MBL-Konzentrationen gesund sind. In mehreren Studien wurden bei Patienten mit niedrigen MBL-Werten weitere Immundefizienzen beobachtet, wie z.B. eine IgG Untergruppendefizienz [97], Chemotaktische Defekte [98] oder Neutropenie [99]. Mehrere Studien beobachteten außerdem kein vermehrtes Vorkommen von Genotypen, die zu niedrigen MBL-Konzentrationen führen, sondern vielmehr schwerere Krankheitsverläufe und mehr Komplikationen, z.B. bei der rheumatoiden Arthritis oder dem sklerosierenden Lupus erythematosus [43].

5.5.2 Gen-Gen-Interaktionen und Haplotypenanalyse

Bei der Erforschung komplexer Merkmale ist es wichtig Gen-Gen-Interaktionen nicht außer Acht zu lassen. Das Vorkommen mehrerer Punktmutationen in der regulatorischen Region eines Gens, führt höchstwahrscheinlich zu einer gegenseitigen Beeinflussung. Diese Gen-Gen-Interaktionen werden durch die Untersuchnug von Allel- oder Genotypfrequenzen nicht erfasst. Durch die Haplotypenanalyse ist es jedoch möglich ein Zusammenspiel zu berücksichtigen oder erst aufzudecken. Da in dieser Arbeit bei den Hepatitis-C-Infizierten signifikante Unterschiede im Therapieansprechen gesehen wurden, wurde bei dieser Gruppe, um Hinweise auf mögliche Gen-Gen-Interaktionen zu

erhalten, eine Haplotypenanalyse durchgeführt, welche zwar einen gleichgerichteten Trend jedoch keine signifikanten Unterschiede zeigte. Bis Dato haben nur wenige genetische Studien zu *MBL*-Polymorphismen diese Tatsache berücksichtigt.

5.5.3 Methodik und Statistik

Bei Fall-Kontrollstudien muss besonderes Augenmerk auf die Auswahl der Population und der Subgruppen gerichtet werden, insbesondere da Allele unterschiedlich verbreitet sind und Krankheitsrisiken in den Subgruppen verschieden hoch sein können. Bei dieser Art von Studien ist eine sorgfältige Auswahl, Stratifizierung und Charakterisierung von Patienten und Kontrollen notwendig, um verfälschende Faktoren zu minimieren [2].

Umweltfaktoren können die Vergleichbarkeit verschiedener Populationen signifikant vermindern. Sie können genetische Effekte sowohl verschleiern als auch zu falsch positiven Ergebnissen führen. Gleiches gilt für individuelle Faktoren wie z.B. Alter und Geschlecht. Auch die Ethnizität ist bei dieser Art von Studien aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens von Allelen ein Faktor, der nicht außer Acht gelassen werden darf. Insofern muss das Nichtbekanntsein der ethnischen Herkunft der Kontrollen als ein Schwachpunkt vorliegender Arbeit angesehen werden. Eine Besonderheit unserer Kontrollgruppe ist weiterhin, dass es sich um eine Neugeborenenkohorte handelt. Aussagen zu späteren Krankheitsverläufen sind somit nicht möglich. Andererseits spiegelt diese Kohorte die Häufigkeit der MBL-Polymorphismen in einer Population gut wider. Das Rekrutieren von Patienten aus Spezialzentren, wie auch in dieser Studie, kann ebenfalls ein verfälschender Faktor sein. Zu kleine Fallzahlen und die Aufsplittung in zu kleine Untergruppen erhöhen die Gefahr falsch positiver Ergebnisse. Die Vergleichbarkeit genetischer Studien kann außerdem durch ein zu großes Spektrum statistischer Methoden erschwert und ihre Aussagekraft vermindert werden. Schlussendlich führt auch die Tendenz, Studien mit positiven Ergebnissen bevorzugt zu veröffentlichen, oftmals zu einer verzerrten Sicht [1].

5.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Diese Studie an einer großen Kohorte mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und unterschiedlichen Krankheitsstadien spricht gegen einen relevanten Einfluss der MBL-Polymorphismen auf das Zustandekommen und auf die Progression einer chronischen Lebererkrankung, weist aber auf einen Einfluss der Exon-1-Polymorphismen auf das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis-C-Infektion hin.

Es scheint immer unwahrscheinlicher, dass das Vorhandensein von Mutationen im *MBL-Gen* zu einer vermehrten Anfälligkeit für Lebererkrankungen führt, und es erhärten sich die Hinweise auf ein schlechteres Therapieansprechen bei Patienten mit MBL-Polymorphismen. Auch auf die Krankheitsprogression scheinen MBL-Polymorphismen eher keinen Einfluss zu haben, auch dies sollte jedoch in weiteren größeren Patientenpopulationen überprüft werden.

Ausreichend große Populationen und die Berücksichtigung verschiedener Ethnizitäten sind notwendig, um genauere Aussagen treffen zu können. Da es für viele Forscher schwierig ist, eine ausreichende Zahl an Patienten mit Leberfibrose aus einer einzelnen Institution zu rekrutieren, wäre es sinnvoll großangelegte Gemeinschaftsprojekte durchzuführen [4].

Sollte es sich als richtig erweisen, dass Träger von MBL-Polymorphismen schlechter als Wildtyp-Träger auf eine antivirale Therapie bei chronischer Hepatitis C reagieren, so würden diese Erkenntnisse es ermöglichen, die betroffenen Patienten engmaschiger zu kontrollieren und eventuell auch effektiver zu therapieren. Sinnvoll erscheint es außerdem, die Aktivierung des Komplementsystems bzw. seine einzelnen Komponenten und ihre Rolle bei viralen Hepatitiden genauer zu untersuchen. Als weitere zukünftige Therapiemaßnahme wäre eine Beeinflussung des Komplementsystems denkbar.

6 Zusammenfassung

Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie führen zur Entwicklung einer Leberfibrose und schlussendlich zur Ausbildung einer Lebercirrhose. Dieser Prozess wird durch diverse exogene Faktoren wie z.B. erhöhter Alkoholkonsum oder Hepatitisvirus-Infektionen und diverse endogene Faktoren, wie u.a. das Alter, die Erkrankungsdauer oder das Geschlecht, beeinflusst. Darüber hinaus wurden eine Reihe von genetischen Sequenzalterationen in Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten und mit einer schnelleren Progression von Leberfibrose gebracht. Hierzu gehören 6 Punktmutationen im MBL2-Gen: die Polymorphismen 52, 54, 57, H/L, X/Y und P/Q, welche mit Ausnahme des P/Q-Polymorphismus zu einer geringeren Serumkonzentration an MBL führen und hiermit zu einer verminderten Komplementaktivierung und Opsonierung. Mehrere Studien weisen bei verschiedenen Lebererkrankungen auf eine schnelle Leberfibroseprogression und ein schlechteres Therapieansprechen bei Polymorphismusträgern hin. Die vorliegende Studie sollte klären, welche Rolle der MBL-Genotyp als Kofaktor der Fibrose- / Cirrhoseentstehung spielt. Es sollte untersucht werden, ob Polymorphismen im MBL2-Gen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen gehäuft auftreten, ob bei Patienten mit chronischer Hepatitis C bestimmte MBL2-Gen-Varianten mit einer schnelleren Fibroseprogression assoziiert sind und ob diese genetischen Varianten das Ansprechen auf eine antivirale Therapie beeinflussen. In die Untersuchung wurden 1468 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und 805 Kontrollen eingeschlossen. Von jedem Patienten wurde, nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung, aus einer Blutprobe DNA extrahiert und die MBL-Genotypen mittels Schmelzkurvenanalyse im Light-Cycler bestimmt. Hierdurch wurden alle bekannten MBL-Punktmutationen, mit Ausnahme des H/L-Polymorphismus detektiert. Die Patienten wurden anhand ihrer Diagnosen in acht Gruppen unterteilt. Die MBL2-Allelfrequenzen, -Genotypfrequenzen und -Haplotypenfrequenzen zwischen Gesunden und den verschiedenen Patientengruppen mit chronischen Lebererkrankungen unterschieden sich nicht signifikant. Die Schwere (der Fibrosegrad) der Lebererkrankung in der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion (N=621) war ebenfalls nicht durch die MBL-Varianten beeinflusst. Zwischen den Patienten, bei denen aufgrund einer dekompensierten Cirrhose eine Lebertransplantation durchgeführt wurde, und

solchen im chronischen Stadium der Erkrankung ohne Lebertransplantation konnten keine Unterschiede beobachtet werden. In der Gruppe der HCV-infizierten Patienten wurde untersucht, ob das Ansprechen auf eine antivirale Therapie durch das Vorliegen eines MBL-Polymorphismus beeinflusst wird. Insgesamt haben 366 Patienten eine Therapie erhalten, eine Heilung der Infektion (SVR) wurde bei 137 (35%) erreicht. In dieser Gruppe wurde ein vermehrtes Vorkommen von Exon-1-Wildtypen mit hohen MBL-Spiegeln gefunden (43,8% der Patienten mit Exon-1-Wildtyp vs. 28,2%der Patienten mit Mutationen im Exon 1, p-Wert 0,009). Der MBL2-Exon-1-Genotyp konnte mittels multivariater Regressionsanalyse unter Einschluss von Alter, Geschlecht, HCV-Genotyp und γGT als unabhängiger Prädiktor für das dauerhafte Therapieansprechen (SVR) bestätigt werden. Die Haplotypenanalyse zeigte einen gleichgerichteten Trend.

Literaturverzeichnis

- [1] Donaldson PT. Genetics of autoimmune and viral liver diseases; understanding the issues. J Hepatol 2004;41:327-332.
- [2] Tariverdian G, Buselmaier W. Humangenetik. 3 ed. Heidelberg: Springer, 2004.
- [3] Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics. 1 ed. Oxford: Bios, 1996.
- [4] Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. Hepatology 2003;37:493-503.
- [5] Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. J Hepatol 2003;38 Suppl 1:S38-53.
- [6] Fleig W, Hahn E: Erkrankungen der Leber. In: Classen D, Kochsiek, ed. Innere Medizin. München: Urban und Schwarzenberg, 1991; 566-569.
- [7] Tauber R, Häussinger D, Reuter W: Leber und Galle. In: Hierholzer K SF, ed. Pathophysiologie des Menschen. Weinheim: VCH, Edition Medizin, 1991; 71-72.
- [8] Poynard T, Mathurin P, Lai CL, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. J Hepatol 2003;38:257-265.
- [9] Takamatsu M, Yamauchi M, Maezawa Y, Saito S, Maeyama S, Uchikoshi T. Genetic polymorphisms of interleukin-1beta in association with the development of alcoholic liver disease in Japanese patients. Am J Gastroenterol 2000;95:1305-1311.
- [10] Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and

- interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. Gut 2001;48:397-402.
- [11] Jones DE, Watt FE, Metcalf JV, Bassendine MF, James OF. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study. J Hepatol 1999;30:402-407.
- [12] Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. Hepatology 1997;26:143-146.
- [13] Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. Hepatology 2000;31:828-833.
- [14] Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, et al. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. Gastroenterology 2003;125:1085-1093.
- [15] Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. Hepatology 2002;36:456-463.
- [16] Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:12766-12771.
- [17] Monazahian M, Bohme I, Bonk S, et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. J Med Virol 1999;57:223-229.
- [18] Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? Genes Immun 2000;1:170-184.

- [19] Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. Gut 2000;46:540-545.
- [20] Day CP, Bashir R, James OF, et al. Investigation of the role of polymorphisms at the alcohol and aldehyde dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol-related end-organ damage. Hepatology 1991;14:798-801.
- [21] Okamoto K, Murawaki Y, Yuasa, Kawasaki H. Effect of ALDH2 and CYP2E1 gene polymorphisms on drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese male workers. Alcohol Clin Exp Res 2001;25:19S-23S.
- [22] Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. Genes Immun 2000;1:386-390.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Song le H BV, Duy DN, et al. MBL-Gene-Polymorphisms and Hepatitis-B-Virus-Infection in Vietnamese Patients. Mutat Research 2003;522:119-125.

- [27] 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.
- [28] Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. Trends Mol Med 2001;7:408-413.
- [29] Schott E, Witt H, Pascu M, et al. Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2007;19:947-951.
- [30] Schott E, Witt H, Neumann K, et al. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-Infection and response to interferone based therapy. J Viral Hepat 2007;15:71-78.
- [31] Schott E, Witt H, Neumann K, et al. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. J Hepatol 2007;47:203-211.
- [32] Corpechot C, Benlian P, Barbu V, Chazouilleres O, Poupon RE, Poupon R. Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? J Hepatol 2001;35:324-328.
- [33] Presanis JS, Kojima M, Sim RB. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). Biochem Soc Trans 2003;31:748-752.
- [34] Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. Rev Immunogenet 2000;2:305-322.
- [35] Ezekowitz RA, Day LE, Herman GA. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate

- lectins. J Exp Med 1988;167:1034-1046.
- [36] Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. Clin Exp Immunol 1992;90:31-35.
- [37] Turner M: Functional Aspect of MB). In: Ezekowitz, ed. Collectins and Innate Immunitiy: Chapman and Hall, 1996; 76.
- [38] Garred P: Genetics of Human-Mannan-Binding-Protein. In: Ezekowitz, ed. Collectins and innate immunity: Chapman and Hall, 1996; 140-141.
- [39] Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. J Biol Chem 1987;262:7451-7454.
- [40] Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. Lancet 1989;2:1236-1239.
- [41] Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. Biochem J 1989;262:763-771.
- [42] Sastry K, Herman GA, Day L, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. J Exp Med 1989;170:1175-1189.
- [43] Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. Transfus Med 2002;12:335-352.

- [44] Antanarakis S. Nomenclature Working Group recommendations for a nomenclature systhem for human gene mutations. Hum Mutat 1998;11:1-3.
- [45] Holmskow U: Collectins in Health and Disease. In: Collectins and Collectin Receptors. Copenhagen: Munhsgaard, 2000.
- [46] Turner MW. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. Immunobiology 1998;199:327-339.
- [47] Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. Mol Immunol 2003;40:73-84.
- [48] Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. J Immunol 1998;161:3169-3175.
- [49] Garred P, Madsen HO, Kurtzhals JA, et al. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. Eur J Immunogenet 1992;19:403-412.
- [50] Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. Eur J Hum Genet 1996;4:13-19.
- [51] Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. J Immunol 1995;155:3013-3020.
- [52] Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? Eur J Immunogenet 1994;21:125-131.

- [53] Garred P: Genetics of Human Mannan-Binding-Protein. In: Ezekowitz, ed. Collectins and Innate Immunity: Chapman and Hall, 1996; 156-159.
- [54] Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 1997;386:506-510.
- [55] Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. J Immunol 2001;167:2861-2868.
- [56] Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RA. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1g receptor. Immunity 1995;3:485-493.
- [57] Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med 2001;194:781-795.
- [58] Koch A, Melbye M, Sorensen P, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. JAMA 2001;285:1316-1321.
- [59] Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. Clin Exp Immunol 2004;136:304-311.
- [60] Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. Lancet 1999;353:1049-1053.
- [61] Garred P, Madsen HO, Svejgaard A, Michaelsen TE. Mannose-binding lectin and

- meningococcal disease. Lancet 1999;354:336; author reply 337.
- [62] Garred P, Michaelsen TE, Bjune G, Thiel S, Svejgaard A. A low serum concentration of mannan-binding protein is not associated with serogroup B or C meningo-coccal disease. Scand J Immunol 1993;37:468-470.
- [63] Garred P, Richter C, Andersen AB, et al. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. Scand J Immunol 1997;46:204-208.
- [64] Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. Mol Immunol 2005;42:145-152.
- [65] Garred P, Pressler T, Madsen HO, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J Clin Invest 1999;104:431-437.
- [66] Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. Scand J Immunol 2000;51:111-122.
- [67] Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1998;13:1984-1990.
- [68] Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis. Am J Kidney Dis 2000;35:401-407.
- [69] Ohsawa I, Ohi H, Endo M, Fujita T, Matsushita M. Evidence of lectin complement pathway activation in poststreptococcal glomerulonephritis. Kidney Int 1999;56:1158-1159.

- [70] Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, et al. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1995;38:110-114.
- [71] Lau YL, Lau CS, Chan SY, Karlberg J, Turner MW. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996;39:706-708.
- [72] Sullivan KE, Wooten C, Goldman D, Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996;39:2046-2051.
- [73] Barton A, Platt H, Salway F, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin (MBL) gene are not associated with radiographic erosions in rheumatoid or inflammatory polyarthritis. J Rheumatol 2004;31:442-447.
- [74] Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, Manfredsdottir V, Geirsson AJ, Valdimarsson H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. J Rheumatol 2001;28:728-734.
- [75] Horiuchi T, Tsukamoto H, Morita C, et al. Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. Genes Immun 2000;1:464-466.
- [76] Ip WK, Lau YL, Chan SY, et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. Arthritis Rheum 2000;43:1679-1687.
- [77] Garred P, Madsen HO, Marquart H, et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. J Rheumatol 2000;27:26-34.
- [78] Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, et al. Mutation of gene of mannose-binding

- protein associated with chronic hepatitis B viral infection. Lancet 1996;348:1417-1419.
- [79] Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. QJM 1998;91:13-18.
- [80] Hoehler T. No Association between MBL-Alleles and Susceptibility to Chronic Hepatitis-B-Virus-Infection in German Patients. Exp Clin Immunogenet 1998;15:130-133.
- [81] Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. Hepatology 1999;29:1248-1251.
- [82] Hakozaki Y, Yoshiba M, Sekiyama K, et al. Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. Liver 2002;22:29-34.
- [83] Jae YC SW, Sun KL, et al. Lack of Association between HBV-Infection and Polymorphism of MBL-gene in Korean Population. J Korean Med Sci 2005;20:65-69.
- [84] Chong WP, To YF, Ip WK, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2005;42:1037-1045.
- [85] Thio CL, Mosbruger T, Astemborski J, et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. J Virol 2005;79:9192-9196.
- [86] Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, et al. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. Arch Virol 1998;143:645-651.

- [87] Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. J Hepatol 1998;29:695-700.
- [88] Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. Scand J Gastroenterol 2000;35:960-965.
- [89] Kilpatrick DC, Delahooke TE, Koch C, Turner ML, Hayes PC. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. Clin Exp Immunol 2003;132:92-95.
- [90] Matsushita M, Miyakawa H, Tanaka A, et al. Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. J Autoimmun 2001;17:251-257.
- [91] Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M, Lenaerts C, Feingold J, Besmond C. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. J Med Genet 2001;38:310-311.
- [92] Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2003;38:518-526.
- [93] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet 2001;68:978-989.
- [94] Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. Am J Hum Genet 2003;73:1162-1169.
- [95] Donaldson PT. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease patho-

- genesis. Gut 2004;53:599-608.
- [96] Valdimarsson H, Stefansson M, Vikingsdottir T, et al. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. Scand J Immunol 1998;48:116-123.
- [97] Aittoniemi J, Baer M, Soppi E, Vesikari T, Miettinen A. Mannan binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. Arch Dis Child 1998;78:245-248.
- [98] Ten RM, Carmona EM, Babovic-Vuksanovic D, Katzmann JA. Mannose-binding lectin deficiency associated with neutrophil chemotactic unresponsiveness to C5a. J Allergy Clin Immunol 1999;104:419-424.
- [99] Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. Lancet 2001;358:637-638.

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Thomas Berg für die Vergabe des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Dr. Juliane Halangk für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Für ihre Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, Ihre Geduld und Kompetenz möchte ich mich bedanken.

Dr. Heiko Witt und Claudia Güldner standen mir in technischen Fragen und bei der Laborarbeit beratend und unterstützend zur Seite. Herr Dr. Konrad Neumann hat durch seine Fachkompetenz und seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Haplotypen die Haplotypenanalyse ermöglicht. Die wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeiter der hepatologischen Ambulanz und der Archive der Charité-Universitätsmedizin Berlin im Virchow-Klinikum haben die Erstellung der Datenbank erleichtert. Ihnen allen gilt mein Dank.

Schliesslich danke ich meiner Familie ohne deren Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Eidestattliche Erklärung

"Ich, Anna Hachfeld, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem

Thema: "Der Einfluss von Polymorphismen des Mannose-Binding-Lectin (MBL 2) auf

die Entwicklung und Progression von chronischen Lebererkrankungen" selbst, ohne die

(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und

Hilfsmittel benutzt, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, den 21. Mai 2008

Anna Hachfeld

103