

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Herr Prof. Dr. D. Häussinger

**Prävalenz und klinische Bedeutung der Hämochromatosegen (HFE)-  
Mutationen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Leberzirrhose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors  
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Christian Mahmoud

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med.dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Erhardt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. O. Adams

# Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1 Hepatitis	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Das Hepatitis C-Virus	1
1.1.3 Infektion und Krankheitsverlauf	1
1.1.4 Serologie	2
1.1.5 Therapiemöglichkeiten	3
1.2 Leberzirrhose	4
1.2.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie der Leberzirrhose	4
1.2.2 Verlauf, Diagnostik und Stadieneinteilung der Leberzirrhose	4
1.2.3 Therapiemöglichkeiten	6
1.3 Hereditäre Hämochromatose	7
1.3.1 Definition und Epidemiologie	7
1.3.2 Genetische Grundlagen der Hämochromatose	8
1.3.3 Klinik, Diagnostik und Krankheitsverlauf	9
1.3.4 Therapiemöglichkeiten	10
1.4 Zusammenhänge und Ziel der Untersuchung	10
<b><u>2. Patienten, Material und Methoden</u></b>	<b>12</b>
2.1 Patienten	12
2.2 Materialien	13
2.2.1 Chemikalien	13
2.2.2 Puffer	13
2.2.3 Enzyme	13
2.2.4 Laborkits	13
2.2.5 Primer	14
2.2.6 DNA-Längenstandard	14
2.3 Methoden	15
2.3.1 Histologische Begutachtung der Leber-Schnittpräparate	15
2.3.2 Extraktion der Patienten-DNA	15
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion	16

	<i>Seite</i>
2.3.4 Semi-nested PCR	18
2.3.5 Restriktion von DNA	20
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese	20
2.3.7 Auswertung des Gentests	21
2.3.8 Statistik	24
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	<b><u>25</u></b>
3.1 Untersuchte Personen und Geschlechterverteilung	25
3.2 Altersstruktur der Patienten und Erkrankungsdauer	26
3.3 Analyse des Einflusses der HFE-Mutation auf die Erkrankungsdauer	27
3.4 Klinische Parameter	27
3.5 Mutationshäufigkeit in den untersuchten Personengruppen	31
3.6 Allelhäufigkeiten in den untersuchten Gruppen	32
3.6 Multivarianzanalysen	34
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b><u>6. Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>46</u></b>
<b><u>7. Anhang</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>8. Danksagung</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>9. Lebenslauf</u></b>	<b><u>53</u></b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Hepatitis C

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Hepatitis C wird durch das Hepatitis C-Virus verursacht. Weltweit sind ca. 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C-Virus infiziert, allein in Europa sind es ca. 4 Millionen, in Deutschland ca. 500.000 Menschen.<sup>1</sup>. Dies entspricht etwa einer Prävalenz von 0,6%.

### 1.1.2 Das Hepatitis C Virus (HCV)

Das Hepatitis C-Virus wurde im Jahre 1989 entdeckt und als Erreger einer der „Non-A-non-B“-Hepatitisen identifiziert. Das HCV ist ein RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae. Die einsträngige Virus-RNA liegt in einem Nukleokapsid aus Kernproteinen. Das Nukleokapsid ist von einer Lipidhülle umgeben. Es sind 6 Genotypen mit 18 Subtypen beschrieben. Mehrfachinfektionen mit den verschiedenen Subtypen sind möglich. In Deutschland finden sich gehäuft die folgenden 3 Subtypen: HCV-1b (ca. 50%), HCV-1a (ca. 20%) sowie HCV-3a (ca.20%).

### 1.1.3 Infektion und Krankheitsverlauf

Das Hepatitis C-Virus wird parenteral übertragen. HCV kann beispielsweise durch kontaminierte (Spritzen-)Nadeln, wie z.B. beim Drogengebrauch, beim Tätowieren oder Piercing übertragen werden. Ein wichtiger Übertragungsweg war bis ca.1990 die Transfusion von Blut oder Blutprodukten.

Heute ist dieser Infektionsweg in Deutschland weitgehend ausgeschlossen, da alle Blutspender getestet werden. Gefährdete Personengruppen sind medizinisches Personal sowie Reinigungspersonal, welches mit infektiösem Blut in Kontakt kommt.

Eine Infektion über Geschlechtsverkehr ist sehr selten, begünstigende Faktoren sind dabei häufige Partnerwechsel, ungeschützter Geschlechtsverkehr sowie traumatische Sexualpraktiken oder im Genitalbereich bestehende Verletzungen. Eine perinatale Infektion von einer HCV positiven Mutter auf ihr Kind ist selten, die Infektionswahrscheinlichkeit ist abhängig von der Viruslast.

Die akute Hepatitis C-Infektion bleibt fast immer unerkannt. Nach einer Inkubationszeit von 1-6 Monaten kann es zu einer grippeartigen Symptomatik kommen, selten kommt es zum Ikterus oder zu Cholestase. Meist verschwinden diese Symptome wieder und ein großer Teil der Patienten kann sich nach vielen Jahren subjektiven Wohlbefindens nicht mehr an eine Krankheit erinnern.

Bei ca. 10-30% der Patienten heilt die Erkrankung aus. Meist schafft es aber das Immunsystem nicht, das Virus zu eliminieren. Bei einer Virusverweildauer im Körper von länger als 6 Monaten spricht man von einer chronischen Hepatitis C.

Die chronische Hepatitis C kann im weiteren Krankheitsverlauf in ca. 20-30% der Fälle zu einer Leberfibrose/-zirrhose führen. Etwa. 2-6% der Leberzirrhosen gehen pro Jahr in ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) über<sup>2</sup>.

Das Leberzellkarzinom und auch die Leberfibrose/-zirrhose sind Erkrankungen, die zum Leberversagen führen können.

#### 1.1.4 Serologie

Der Verdacht auf eine Hepatitis C-Infektion wird oft im Rahmen der Routineblutuntersuchung gestellt, wenn die Leberenzymwerte GOT, GPT oder  $\gamma$ -GT erhöht sind. Eine Leberenzymwerterhöhung ist ein unspezifischer Hinweis, normale Leberwerte schließen eine HCV-Infektion jedoch nicht aus. Um Klarheit über das HCV als Ursache einer Krankheit zu bekommen, sollte als nächstes ein Nachweis von spezifischen HCV-Antikörpern (anti-HCV) aus dem Blut erfolgen. Nach ca. 3-6 Wochen post infectionem können mittels ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) -Tests zuverlässig HCV-Antikörper als Immunantwort des Körpers auf das Virus nachgewiesen werden. Die HCV-Antikörper

verbleiben jahre- bis jahrzehntelang nach der Infektion im Körper nachweisbar, sie lassen also keine Rückschlüsse auf den Erkrankungsbeginn und die Erkrankungsaktivität zu.

Um das Virus und seinen Genotyp direkt nachzuweisen und um Erkenntnisse über die Viruslast zu erhalten, wird mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) die Virus-RNA qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Die Ultraschalluntersuchung der Leber kann hinweisend für eine Leberzirrhose oder ein HCC sein. Eine Leberpunktion mit histologischer Begutachtung vervollständigt die Diagnostik und gibt Auskunft über das tatsächliche Stadium der Leberschädigung bzw. über die Ausbildung einer Leberzirrhose oder eines Leberzellkarzinoms.

#### 1.1.5 Therapiemöglichkeiten

Die Hepatitis C wird zur Zeit mit einer Kombinationstherapie aus pegyliertem (PEG-) Interferon alpha und Ribavirin behandelt. Interferon alpha ist ein aus 165 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das vom menschlichen Körper selbst hergestellt wird.

Interferone sind Substanzen, die an der Zielzelle antiviral, antiproliferativ und immunmodulatorisch wirken. Das zur Therapie eingesetzte, gentechnisch synthetisierte Interferon alpha wird durch Ankopplung von Poly-Ethylen-Glykol(PEG)-Ketten modifiziert („pegyliert“), hierdurch wird die Halbwertszeit des Interferons verlängert. Eine einmalige Injektion pro Woche reicht aus, um effiziente Wirkspiegel zu erreichen.

Ribavirin ist eine virostatistische Substanz, die in Studien in Kombination mit PEG-Interferon alpha einen synergistischen Effekt bewiesen hat. Ribavirin ist als Monosubstanz bei HCV-Infektion wirkungslos. Ribavirin ist ein Nukleosidanalogen, es hemmt die RNA-Synthese durch Kettenabbruch und damit die Virusvermehrung. Das therapeutische Zusammenspiel von PEG-Interferon alpha mit Ribavirin in Bezug auf HCV ist noch nicht genau geklärt<sup>3</sup>. Der therapeutische Erfolg ist auch abhängig vom Virusgenotyp. Die besten Heilungserfolge zeigen Patienten mit Virusgenotyp 2 und 3; über 75% dieser Patienten können bei rechtzeitiger Diagnosestellung geheilt werden. Bei Patienten mit Genotyp 1 sind ca. 50% Heilungserfolge zu verbuchen. Ein HCV-Patient gilt dann als geheilt, wenn die Transaminasen über 6 Monate dauernd normalwertig sind und das Virus in der PCR nicht mehr nachweisbar ist.

## 1.2 Leberzirrhose

### 1.2.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie der Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist eine oft multifaktoriell verursachte, narbig-bindegewebige Durchbauung der Leber mit irreversibler Zerstörung der Gefäß- und Läppchenarchitektur und Zerstörung der Leberzellen. Die Leber verändert sich knotig und büßt dabei fortschreitend ihre Funktionsfähigkeit als Entgiftungs- und Syntheseorgan ein.

In Europa und den USA erkranken ca. 250/100000 Einwohner pro Jahr an einer Leberzirrhose, dabei etwa doppelt so viele Männer wie Frauen. Die wichtigsten Ursachen der Leberzirrhose in Europa und den USA sind der Alkoholmißbrauch, sowie B-/C-/D-Virushepatitiden. Weitere, seltenere Ursachen sind Stoffwechselkrankheiten wie z.B. Hämochromatose, M.Wilson, alpha 1-Antitrypsinmangel, medikamenteninduzierte und toxische Leberschäden, Autoimmunheptitis, primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, kardiale Stauungsleber (infolge einer Rechtsherzinsuffizienz oder eines „Panzerherzens“), Budd-Chiari-Syndrom (Lebervenenverschluß) oder Tropenerkrankungen z.B. Bilharziose oder Leberegelbefall.

### 1.2.2 Verlauf, Diagnostik und Stadieneinteilung der Leberzirrhose

Die Leberzirrhose kann lange Zeit asymptomatisch verlaufen. Bei fortgeschrittener Leberzirrhose verspüren die Patienten oft eine allgemeine Müdigkeit, Abgeschlagenheit mit Leistungsminderung sowie Druck- und Völlegefühl im Oberbauch, evtl. mit Übelkeit, Verdauungsstörungen und Gewichtsabnahme. Bei der körperlichen Untersuchung ist die Leber oft vergrößert, verhärtet und auch mit höckriger Oberfläche zu tasten.

Als Zeichen der portalen Hypertension, die durch eine Zerstörung der Lebergefäßarchitektur mit (portal-)venöser Stauung bedingt ist, können gefunden werden:

- Ösophagusvarizen (Erweiterung der Ösophagusgefäße über den Kollateralweg der V.coronaria ventriculi),
- äußere Hämorrhoiden (Erweiterung des Plexus haemorrhoidalis als Kollaterale),
- Caput medusae (Kollateralgefäßerweiterung unter der Bauchhaut).

Durch die Stauung in der Pfortaderstrombahn und fehlenden onkotischen Druck (hauptsächlich infolge Albuminmangels) bildet sich eine Bauchwassersucht (Ascites) aus. Diese Flüssigkeitsmenge kann bis zu 15l und mehr betragen. Der Ausfall der Leber als Entgiftungs- und Syntheseorgan des Körpers führt zur Ansammlung von Giftstoffen, wie z.B. Ammoniak und zur geringeren Verfügbarkeit wichtiger Syntheseprodukte, wie z.B. Cholinesterase, Albumin, Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren, Antithrombin III. Diese Veränderungen lassen sich labormedizinisch nachweisen und dienen so auch der Diagnostik der Leberzirrhose.

Die sogenannten Leberhautzeichen bilden sich als Folge der Stoffwechselstörung aus:

- Spider naevi
- Hautatrophie mit Teleangiektasien
- Palmar- und Plantarerythem
- Lacklippen und Lackzunge
- Weißnägel
- Dupuytren'sche Kontrakturen
- Juckreiz mit Kratzspuren und evtl. Ikterus

Da in der Leber wichtige Schritte des Hormonaufbaus und -abbaus stattfinden, kommt es zu hormonellen Störungen, insbesondere des Testosteron-/Östrogengleichgewichts. Zeichen dieser hormonellen Verschiebung zum relativen Überwiegen des Östrogenanteils sind bei Männern Bauchglatze, Hodenatrophie, Potenzstörungen und Gynäkomastie, bei Frauen Menstruationsstörungen und eventuell sekundäre Amenorrhoe.

Die Leberzirrhose bleibt im Anfangsstadium vom Patienten meist unbemerkt, leichte Allgemeinsymptome (s.o.) können hinweisend sein. Im weiteren Verlauf, der stark von der zugrundeliegenden Lebererkrankung abhängt, zeigen sich zunehmend die o.g. Zeichen der Leberparenchymzerstörung. Bei länger bestehender, fortgeschrittener Zirrhose treten als lebensgefährliche Komplikationen Ösophagusvarizenblutungen, Leberausfallkoma und Leberzellkarzinom auf.

Die Leberzirrhose wurde nach ihrem klinischen Schweregrad von Child und Pugh in drei Grade eingeteilt, dazu bedient man sich klinisch relevanter Parameter wie Albumin i.S., Bilirubin i.S., Quick, Ascitesnachweis im Ultraschall, klinischem Nachweis der hepatischen Enzephalopathie z.B. über die kritische Flimmerfrequenz<sup>4</sup>.

<b>Child-Pugh-Kriterien</b>	<b>1 Punkt</b>	<b>2 Punkte</b>	<b>3 Punkte</b>
<b>Albumin im Serum</b> [g/dl]	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
<b>Bilirubin im Serum</b> [mg/dl]	> 2,5	2,0 – 3,0	> 3,0
<b>Quick [%]</b>	> 70	40 – 70	< 40
<b>Ascites</b>	-	+ - ++	+++
<b>Encephalopathie</b>	-	I – II	III – IV
<b>Gesamtpunktzahl:</b>	<b>Child A = 5 –6</b>		
	<b>Child B = 7 - 9</b>		
	<b>Child C = 10 - 15</b>		

Abbildung 1: Child-Pugh-Kriterien des Schweregrades der Leberzirrhose

### 1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Die therapeutischen Möglichkeiten bei Leberzirrhose zielen darauf ab, den Zustand des Patienten zu stabilisieren und ein Fortschreiten des Leberparenchymuntergangs mit bindegewebiger Durchbauung zu verhindern. Ein einmal stattgefundenener Parenchymbau ist in der Regel irreversibel und kann therapeutisch nicht beeinflusst werden.

Da die Leberzirrhose eine Folgeerscheinung anderer Lebererkrankungen ist, ist die Therapie der Grunderkrankung an wichtigster Stelle zu nennen – je nach Ursache kann das z.B. eine Medikamenten-/Alkoholabstinenz, immunsuppressive oder antivirale Therapie, Eisenentzug mittels Aderlassen bei Hämochromatose oder D-Penicillamintherapie bei M.Wilson bedeuten. Ferner ist gegebenenfalls eine Vitaminsubstitution notwendig– bei Alkoholikern insbesondere Vitamin B1 und B12, bei biliärer Zirrhose die Substitution der fettlöslichen Vitamine A/D/E/K.

Zur Früherkennung eventueller Komplikationen und auch zur Erkennung eines Leberzellkarzinomes als Endstadium einer Leberzirrhose sollten regelmäßige Untersuchungen mit Ultraschall und Blutentnahmen mit Kontrolle des alpha1-Fetoproteines durchgeführt werden.

Bei fortgeschrittener Zirrhose bleibt als letzte therapeutische Option die Lebertransplantation. Die Prognose der Leberzirrhose ist stark von der Ätiologie und dem Erkrankungsstadium abhängig.

Tabelle 1: 1-Jahres Mortalität der Leberzirrhose <sup>5</sup>

<b>Stadium:</b> Child A: geringe Mortalität
Child B: 20 – 40 %
Child C: 40 – 60 %

### **1.3 Hereditäre Hämochromatose (HH)**

#### 1.3.1 Definition und Epidemiologie

Die hereditäre Hämochromatose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, bei der eine verstärkte Resorption von Eisen im Dünndarm zu Eisenakkumulation führt. Eisenablagerungen in verschiedenen Organen führen zu deren Funktionseinschränkung. In Deutschland ist die HH eine der häufigsten Erbkrankheiten. Die Genfrequenz beträgt 5-10% und der Anteil homozygoter Genträger liegt bei 1:100 bis 1:400 in der Bevölkerung <sup>6</sup>.

Das klassische klinische Bild der HH wurde bereits 1865 beschrieben: Der „Bronzediabetes“ mit bronzefarbiger Hautpigmentierung Diabetes mellitus und Leberzirrhose. Weitere Symptome sind Arthropahie, Leistungsschwäche, Kardiomyopathie und Impotenz. Von Recklinghausen führte sie auf eine Eisenüberladung der jeweiligen Organe zurück und prägte den Begriff „Hämochromatose“ <sup>7</sup>.

### 1.3.2 Genetische Grundlagen der Hämochromatose

Bereits 1976 vermuteten Simon et al. das Hämochromatosegen (HFE-Gen) in der Nähe des MHC (Major Histocompatibility Complex)-HLA (Human Leucocyte Antigene)-A3-Gens auf dem Chromosom Nr.6. Anfangs wurde das Hämochromatosegen dem MHC zugerechnet und als HLA-H-Gen bezeichnet <sup>8</sup>. Der für die hereditäre Hämochromatose verantwortliche Gendefekt konnte schließlich 1996 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 nachgewiesen werden. Eine Punktmutation mit Austausch von Guanosin gegen Adenosin an der Nucleotidposition 845 des HFE-Gens scheint die Hauptrolle bei der HH in Nordeuropa zu spielen <sup>9</sup>. Eine weitere bedeutende Mutation fand man an der Nucleotidposition 187, dort liegt ein Austausch von Cytidin gegen Guanosin vor <sup>9</sup>.

Die Punktmutation an der Stelle 845 des HFE-Gens führt im Genprodukt zu einem Austausch der Aminosäure Cystein gegen Tyrosin an Aminosäureposition 282 (C282Y). Dies hat die Zerstörung einer Disulfidbrücke im Protein zur Folge, welche einen Verlust der Wechselwirkung des Proteins zum assoziierten  $\beta$ 2-Mikroglobulin bedingt. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, daß der Verlust dieser Wechselwirkung einen Regulationsverlust der Affinität des Transferrinrezeptors zu seinem Liganden Transferrin bedingt <sup>10</sup>, was eine erhöhte Eisenakkumulation zur Folge hat. Die Cytosin-/Guanosin-Punktmutation an Stelle 187 bedingt einen Austausch der Aminosäuren Histidin gegen Asparagin an der Aminosäureposition 63 (H63D). Dieser Aminosäureaustausch beeinflusst die Transferrinrezeptoraffinität nicht, scheint aber die pH-abhängige Regulation der Interaktion zwischen HFE-Protein/Transferrinrezeptor/Transferrin zu beeinflussen. Der genaue Mechanismus auf molekularer Ebene ist aber noch nicht geklärt. Eine Homozygotie an der Stelle 187 des HFE-Gens scheint allein aber keine HH zu bedingen, wohl aber eine kombinierte Heterozygotie an den Stellen 187 und 845 des HFE-Gens (sogenannte Compound-Mutation) <sup>11</sup>. Bei weltweiten Untersuchungen an Hämochromatosepatienten hat man im Gegensatz zur C282Y-Prävalenz der HFE-Genmutation von nahezu 90% in den nordeuropäischen Ländern in den Mittelmeerstaaten Genfrequenzen von ca. 64% und in Afrika, Indien und Ostasien gar Genhäufigkeiten von unter 1% gefunden <sup>12, 13</sup>. Weitere Mutationen an anderen Nucleotidpositionen z.B. 193 (S65C), 314 und 277 können ebenfalls das Krankheitsbild der hereditären Hämochromatose hervorrufen.

### 1.3.3 Klinik, Diagnostik und Krankheitsverlauf

Es sind zwei Formen der HH bekannt, die *juvenile* Form, bei der es schon intrauterin zur Ausbildung einer Leberzirrhose kommt und die *adulte* Form der HH. Die juvenile Form endet meist letal.

Ein Patient, der an der adulten Form der hereditären Hämochromatose erkrankt ist, resorbiert unabhängig vom Eisenbedarf vermehrt und unkontrolliert Eisen. Es werden dann, je nach Ernährung, die 10-20fache Eisenmenge über den Dünndarm resorbiert, beim Gesunden sind es ca. 1-2mg/d.

Wenn der normale Körpereisengehalt (Mann: bis ca. 3,5g / Frau: bis ca. 2,2g) etwa sein Fünffaches erreicht hat, kann es zu Organschäden kommen.

Die Eisenablagerungen führen vor allem zu:

- Leberzirrhose (75%)
- Diabetes mellitus (70%)
- dunkle Hautpigmentierung (75%)
- sek. Kardiomyopathie durch Eisenablagerung evtl. mit Rhythmusstörungen und Herzinsuffizienz <sup>14</sup>
- Hepatomegalie (90%)
- Splenomegalie (15%)
- schmerzhafte Arthropathie (30%) <sup>15</sup>
- endokrinen Störungen mit Nebennierenrinden-, Gonaden- und Hypophysenschäden

Die ersten drei genannten Manifestationszeichen – Leberzirrhose, Diabetes mellitus und dunkle Pigmentierung - führten zu der Bezeichnung Trousseau's: „Trias des Bronzediabetes“<sup>7</sup>. Als bedeutsamste Komplikationen der HH sind die Leberzirrhose und deren Übergang in ein Leberzellkarzinom (HCC) zu nennen <sup>16, 17</sup>. Ca. 30% der Patienten mit HH sterben an einem HCC. Patienten, bei denen die HH frühzeitig entdeckt und behandelt wird, haben eine normale Lebenserwartung <sup>18</sup>. Diagnostisch wichtige Parameter sind das Serumeisen (erhöht bei HH), Ferritin (>500µg/l bei HH) und die Transferrinsättigung (>60% bei HH) <sup>18</sup>.

Die Eigen-/Familienanamnese kann wertvolle diagnostische Hinweise ergeben, ein Gentest und evtl. eine Familienscreeninguntersuchung kann den Verdacht bestätigen.<sup>8</sup> Mittels SQUID-Biomagnetometer (elektromagnetische nichtinvasive Lebereisenbestimmung) kann der Lebereisengehalt bestimmt werden, mittels Leberbiopsie kann man den Fibrosegrad und den Eisengehalt der Leber einschätzen. Regelmäßige Ultraschalluntersuchungen lassen zirrhotische Veränderungen erkennen und ermöglichen zusammen mit alpha-Fetoproteinbestimmungen im Blut die Früherkennung des Leberzellkarzinoms.

#### 1.3.4 Therapiemöglichkeiten

Eine effektivste Therapiemaßnahme zur Eisenelemination ist die Aderlaßtherapie. Mit 500ml Blut werden ca. 250mg Eisen entfernt<sup>7</sup>. Regelmäßige, wöchentliche Blutentnahmen sollten stattfinden, bis das Serumferritin auf ca. <20-50µg/l absinkt, dann sind die Eisenspeicher ausreichend entleert. Danach sind Aderlässe in größeren Abständen ausreichend.

Eine eisenarme Diät kann unterstützend wirken. So vermindert zu den Mahlzeiten getrunkenen Schwarzer Tee die Eisenresorption. Vitamin C-reiche Nahrung sollte vermieden werden, da Vitamin C die Eisenresorption steigert.

Die Medikamente Deferoxamin (Desferal) und das Reservemittel Deferiprone werden bei hereditärer Hämochromatose selten eingesetzt und dienen in der Regel der Therapie sekundärer Häm siderosen.

#### **1.4 Zusammenhänge und Ziel der Untersuchung**

Wie bisher ausgeführt kann sowohl eine Virushepatitis C, wie auch die hereditäre Hämochromatose zu einer Leberzirrhose führen<sup>19,20</sup>.

Die Leberzirrhose ist eine Erkrankung, die die Lebensqualität und auch die Lebenserwartung eines Patienten deutlich einschränkt. Häufig versterben Patienten an den Komplikationen der Leberzirrhose wie z.B. Ösophagusvarizenblutung, Leberausfallkoma oder dem primären Leberzellkarzinom.

Auch andere Faktoren wie z.B. Alkoholkonsum, lebertoxische Drogen oder Medikamente, wie auch M.Wilson als Stoffwechselkrankheit oder Autoimmunerkrankungen können zur Entstehung einer Leberzirrhose beitragen.

Durch die Verbreitung des Hämochromatosegenestes konnte gezeigt werden, daß der hereditären Hämochromatose möglicherweise eine größere als bisher angenommene Rolle bei der Entstehung von Leberzirrhosen zukommt. Dies gilt umso mehr, als die C282Y- und H63D-Mutation eine der häufigsten Mutationen in der nordeuropäischen Bevölkerung darstellt. Insbesondere die heterozygote Erbanlage der Eisenspeicherkrankheit als Kofaktor der Leberzirrhosebildung im Zusammenhang mit anderen Lebererkrankungen ist bisher nicht ausreichend erforscht.

Bisherige Erkenntnisse zeigen an, daß heterozygote Erbanlagenträger in der Regel nicht manifest erkranken, aber dazu neigen, Eisen zu akkumulieren, was den Verlauf anderer Lebererkrankungen möglicherweise negativ beeinflusst.

Die vorliegende Dissertation hat zum Ziel, die Rolle der heterozygoten HFE-Gen-Mutationen und des Eisens als Kofaktoren bei der Entstehung einer Leberzirrhose an Patienten mit Hepatitis C zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden 161 Patienten der Hepatitisambulanz der Uniklinik Düsseldorf mit Hepatitis C und manifester Leberzirrhose (Fibrosegrad F4) untersucht und mit einer Vergleichsgruppe von 157 Patienten mit Hepatitis C und Leberfibrose (Fibrosegrade F0 – F3) und mit einem gesunden Kollektiv von 290 Patienten bezüglich ihres HFE-Genstatus und klinischer Parameter verglichen.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Es wurden 290 gesunde Personen und 318 Patienten aus den Jahren 1996 bis 2003 mit Hepatitis C und Leberzirrhose aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Uniklinik Düsseldorf untersucht.

Folgende Parameter wurden für die Untersuchung erfasst:

Name, Vorname, Geschlecht, Alter bei Untersuchung in Jahren, Geburtsdatum, ggf. Sterbezeitpunkt, Erstdiagnose der HCV-Infektion, Zeitpunkt der Infektion (wenn bekannt), Datum der Leberpunktion, Fibrose (-grad)/ Zirrhose (-grad), HCC, HCV-RNA Nachweis, HCV-Genotyp, GOT, GPT, GGT, Quick-Wert, Serum-Fe, Ferritin, Transferrin, Bilirubin, Albumin absolut, alpha-Fetoprotein, Ascites (ja/nein), Gelenkprobleme (ja/nein), Herzprobleme (ja/nein), Diabetes mellitus (ja/nein).

Eine chronische HCV-Infektion wurde definiert als Nachweis von HCV-Antikörpern über 6 Monate und Nachweis von HCV-RNA über 6 Monate. Patienten mit anderen Ursachen für Lebererkrankungen, wie hoher Alkoholkonsum, Medikamentenabusus oder Patienten mit wiederholten Bluttransfusionen wurden ausgeschlossen.

Das Vorliegen einer Leberzirrhose und/oder eines hepatozellulären Karzinoms wurde mittels Leberstanzbiopsie oder mittels intraoperativer Leberprobeexzision durch das Pathologische Institut der Uniklinik Düsseldorf gesichert (Dr. A. Donner, Institut für Pathologie).

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chemikalien

Small DNA-Agarose (Fa. Biozym), Borsäure (Fa. Merck), EDTA = Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (Fa. Sigma chemical), Ethidiumbromid 1% (Fa. Merck), Loading Dye Solution (Fa. MBI Fermentas), TRIS = Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. ICN Biomedical), Tween 20

### 2.2.2 Puffer

Digestionspuffer: 65 mM TRIS-HCl pH 7,5,  
100 mM EDTA,  
0,1% Tween 20,  
Aqua ad 500 ml

TBE-Puffer (10x): 1 M TRIS-HCl pH 8,3,  
0,83 M Borsäure,  
10 mM EDTA

Restriktionspuffer: NEBuffer 1, NEBuffer 3 (Fa. New England Biolabs)

### 2.2.3 Enzyme

Proteinase K (Fa. Qiagen),

Restriktionsenzyme *Rsa I*, *Mbo I* (Fa. New England Biolabs)

### 2.2.4 Laborkits

QIAmp DNA Mini Kit (Fa. Qiagen),

HotStarTaq Master Mix Kit (Fa. Qiagen)

### 2.2.5 Primer

Die Primer für die PCR wurden bezogen von der Fa.MWG Biotech.

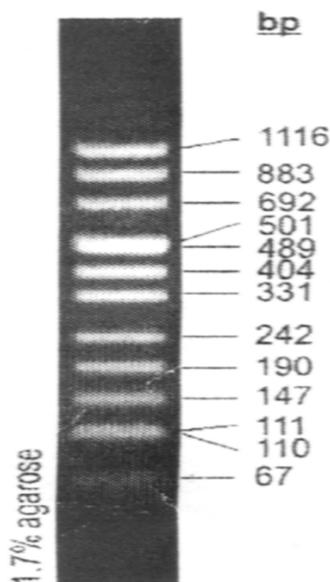
Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die Sequenz des HFE-Gens.

<u>Primer:</u>	<u>Sequenz:</u>	<u>Spezifität:</u>
Hem- s-G845A	5'-TGG CAA GGG TAA ACA GAT CC-3'	HFE-Gen Pos.:565-585
Hem-as-G845A	5'-CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC-3'	HFE-Gen Pos.:936-955
HFE-short-s-G845A	5'-TGG ATG CCA AGG AGT TCG A-3'	HFE-Gen Pos.:736-755
HFE- s-G845A-for seminest	5'-GAC CTA CCG GGC TGG A-3'	HFE-Gen Pos.:786-802
Hem- s-C187G	5'-ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC-3'	HFE-Gen Pos.:46-65
Hem-as-C187G	5'-ATT TCA AGC CAG ATG TGG C-3'	HFE-Gen Pos.:234-254
HFE- s-C187G-for seminest	5'-CGT GGA TGA CCA GCT GTT-3'	HFE-Gen Pos.:156-173

### 2.2.6 DNA-Längenstandard

Als DNA-Längenstandard wurde der pUC Mix Marker Nr.8 der Fa. MBI Fermentas benutzt.

Der pUC Mix Marker Nr.VIII enthält folgende Fragmente: 1116, 883, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67



#### pUC Mix Marker Nr.8

Längenstandard-Banden im 1,7%-Agarosegel.

(bp=Basenpaare)

(Abbildung modifiziert nach Fa. MBI Fermentas.)

Abbildung 2: Banden des DNA-Längenstandards im Agarosegel

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Histologische Begutachtung der Leber-Schnittpräparate**

Klassifizieren der standardmäßig gefärbten Leberpräparate nach Entzündungsaktivität und Fibrosegrad nach dem HAI(histological activity index)-Score nach Knodell<sup>21</sup> und klassifizieren der Leberpräparate je nach Eisengehalt mittels Scheuer-Score<sup>22</sup> nach Färben mit Preussisch-Blau, beides durch einen unabhängigen Pathologen ohne Kenntnis der sonstigen klinischen Parameter und Laborparameter der Patienten (Dr. A. Donner, Institut für Pathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).

### **2.3.2 Extraktion der Patienten-DNA**

#### *DNA-Extraktion aus Blut*

Die DNA-Extraktion aus Patientenblut erfolgte mit Hilfe des Qiagen DNA Mini Kit nach dem Blood and Body Fluid Spin Protokoll.

200µl der Patientenblutprobe (venöses Blut aus Citratröhrchen) wurde mit 20µl Proteinase K und 200µl Puffer AL aus dem Kit versetzt und 15s gut vermischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 56°C im Wasserbad.

200µl Ethanol 96-100% wurden hinzugefügt und die Proben erneut für 15s geschüttelt.

Die Probenmischung wurde in eine Qiagen Spin column überführt und bei 8000U/min in einer Zentrifuge der Fa.Eppendorf für 1min zentrifugiert, um die Patienten-DNA im Spezialfilter der Filtersäule zu binden und Zellreste davon zu trennen.

Anschließend folgten zwei Wasch-Schritte – dabei wurden jeweils 500µl des Waschpuffers AW 1 und AW 2 zugegeben und nachfolgend bei 8000 bzw 14000U/min zentrifugiert.

Um die Patienten-DNA aus dem Filter zu eluieren, wurde der Filter mit 200µl Puffer AE benetzt und nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei 8000U/min für 1min zentrifugiert. Die Lagerung der extrahierten Patienten-DNA erfolgte bei –20°C.

#### *DNA-Extraktion aus paraffinierten Gewebeproben*

Um Patienten-DNA aus paraffinierten Gewebeproben zu extrahieren, mußten die Objektträger mit den Schnittpräparaten (ungefärbte Leerschnitte der Gewebeproben aus der Pathologie)

zuerst entparaffiniert werden – dies geschah durch Lösen der Paraffinschichten im Xylolbad für initial 15min, dann nochmals 10min. Durch eine 2x5minütige Inkubation der Proben in einem Ethanolbad einer absteigenden Konzentrationsreihe von 100% bis 30% in 4 Schritten wurden die Gewebeprobe nochmals gereinigt. Nach einer 2x5minütigen Inkubation der Proben im Wasserbad wurden die Proben vom Objektträger mit einem sterilen Skalpell in eine Lösung aus Digestionspuffer/Proteinase K im Verhältnis 10:1 gegeben und für 20h bei 55°C inkubiert, um die DNA zu extrahieren.

Die extrahierte DNA wurde im Thermomixer bei 94°C 7min lang inkubiert um die Proteinase K zu deaktivieren. Die Proben wurden anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### *Ablauf der Versuchs-PCR*

In vorliegender Versuchsreihe wurde das PCR – HotStarTaq Master Mix - Kit der Firma Qiagen verwendet. Als Primer wurden für den Genabschnitt mit der Mutation C282Y Hem-s-G845A sowie Hem-as-G845A der Firma MWG Biotech AG verwendet.

Für H63D kamen die Primer Hem-s-C187G sowie Hem-as-C187G der Firma MWG Biotech AG zum Einsatz.

Abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer wurde die Annealing-Temperatur von 54°C gewählt (zur Bestimmung der Annealing-Temperatur - s.u.).

Die PCR fand in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (Gene Amp PCR-System 9700, Applied Biosystems) statt, an dem folgendes Programm eingestellt wurde:

95°C 15min – Die initiale Erhitzung auf 95°C ist notwendig um die Enzyme des PCR-Kits zu aktivieren sog. „Hot Start“.

Die eigentliche PCR-Reaktion läuft in drei Schritten ab:

I. Denaturieren bei 95°C für 40s – die DNA- Doppelstränge werden in Einzelstränge aufgeschmolzen.

II. Annealing bei 54°C für 40s– die Oligonukleotidprimer hybridisieren mit den DNA-Einzelsträngen, dabei ist die Reaktionstemperatur abhängig von den verwendeten Primern (s.u.).

III. Polymerisation bei 72°C für 40s– die Primer dienen der Polymerase als Startmoleküle und bei 72°C werden die Matrizenstränge amplifiziert.

Diese drei Schritte laufen in vorliegendem Versuch 40 mal hintereinander ab – dabei dient die Kopie der vorherigen Reaktion als Matrize für die nächste Reaktion. So ist es möglich einen bestimmten DNA-Teilbereich zwischen den Primern ca.  $10^6$  bis  $10^8$  mal anzureichern.

Nach Inkubation bei 72°C für 7min erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben oder Aufbewahrung bei 4°C.

Pro PCR-Ansatz wurde in vorliegendem Versuch ein Reaktionsansatz-Gesamtvolumen von 50µl für die PCR verwendet.

Folgenden Reagenzienverhältnisse wurden eingesetzt:

Für C282Y :	25µl HotStarMix	für H63D :	25µl HotStarMix
	18µl Aqua bidest		14µl Aqua bidest
	1µl Primer Hem- s-G845A		2µl Primer Hem- s-C187G
	1µl Primer Hem-as-G845A		2µl Primer Hem-as-C187G
	+ 5µl DNA-Aufschluß		+ 7µl DNA-Aufschluß

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die PCR-Ansätze nur an speziellen, amplikatfreien Arbeitsplätzen hinter Plexiglas mit aerosolfreien Einmal-Pipettenspitzen pipettiert.

Serum und Gewebepreparate wurden ebenfalls nur in amplikatfreien Räumen aufgeschlossen und alle Lösungen wurden in kleinen Volumina aliquotiert. Es wurden Einmal-Handschuhe und Kittel getragen, desweiteren wurden nur Einmal-Artikel verwendet, die nicht autoklaviert werden mußten. Um die Pipettierschritte zu reduzieren, wurde für alle Ansätze initial ein Maxi-Mix erstellt, dieser enthielt alle Reagenzien bis auf die DNA-Aufschlüsse.

Die Reagenzien sowie der Maxi-Mix wurden auf Eis gelagert, der Maxi-Mix auf die PCR-Gefäße verteilt und die kurz vorher aufgetauten DNA-Aufschlüsse wurden hinzupipettiert.

Nachdem der Thermocycler die Starttemperatur erreicht hatte, wurden die PCR-Proben vom Eis in das Gerät eingesetzt und das PCR-Programm gestartet.

#### *Berechnung der Annealing-Temperatur von Oligonukleotiden*

Die optimale Annealing-Temperatur liegt ca. 5°C unter der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der Oligonukleotide – Berechnung nach der Rule of Thumb:

$$T_m (\text{Oligonukleotid} < 24 \text{ Basen}) = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$$

Exaktere Berechnung der Schmelztemperatur nach der folgenden Formel:

$$T_m = 86,35 + 0,41 \times (\% G+C) - (600/N) ; N = \text{Anzahl der Basen.}$$

#### 2.3.4 Semi-nested PCR

Eine Semi-nested PCR ist die weitere Amplifikation eines durch eine PCR amplifizierten DNA-Abschnitts. Bei der Semi-nested PCR wird ein Semi-nested Primer (sense) verwendet, der innerhalb des Genbereiches hybridisiert, der von den Primern der vorhergehenden PCR flankiert wird. Als zweiter Primer kann der Primer (antisense) der Primär-PCR weiterverwendet werden. Die Technik der Semi-nested PCR kann dann benutzt werden, wenn es erwünscht ist, die Menge eines DNA-Amplifikates weiter zu potenzieren, z.B. wenn die Ausgangsmenge des Templates sehr gering ist. Der Nachteil der Semi-nested PCR liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit für Kontaminationen.



### 2.3.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion der PCR-Produkte dient dazu, die bei der PCR amplifizierte Abschnitte der genomischen DNA in Fragmente zu teilen, die sich bei der anschließenden Gelelektrophorese in charakteristischer Weise je nach Größe darstellen, und damit eine Differenzierung zwischen Wildtyp, Heterozygotie oder einer Mutation bezüglich eines Merkmals erlauben.

Es wurde bei den vorliegenden Versuchen das Restriktionsenzym *Rsa* I in Verbindung mit dem Puffer *NEB* 1 für die Restriktion bei Genlocus C282Y und Restriktionsenzym *Mbo* I mit Puffer *NEB* 3 für Genlocus H63D (alles Fa. New England Biolabs) verwendet.

Restriktionsenzym *Rsa* I hydrolysiert die amplifizierte DNA-Sequenzen folgendermaßen:

5'...G T // A C...3

Das Restriktionsenzym *Mbo* I hydrolysiert die DNA-Amplifikate an der Stelle

5'...//G A T C ...3

Beide Restriktionsenzyme bedürfen einer Inkubationstemperatur von 37°C und können bei 65°C hitzeinaktiviert werden. In einem Gesamtvolumen von 17,2µl bzw. 17,6µl wurden 12µl der PCR-Produkte mit 10u Restriktionsenzym *Mbo* I/ 8u *Rsa* I, 0,5µl des entsprechenden Puffers und 4,3µl Aqua bidest vermischt. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 5,5 Stunden inkubiert.

### 2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR zu kontrollieren, bzw. die Restriktionsprodukte ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde die Gel-Elektrophorese benutzt.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern die DNA- und RNA-Moleküle je nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit - entsprechend ihrer Ladung und Größe - in einem elektrischen Feld im Agarosegel. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner ist die Porengröße – umso kleiner sind folglich die Molekülgrößen, die voneinander getrennt werden können.

In vorliegenden Versuchen wurde eine Small DNA-Agarose (Fa.Biozym, Oldendorf) in einer 2,5%-Konzentration verwendet. 5g Agarose wurden in 200ml 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose auf ca. 60°C wurden 10µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Das Ethidiumbromid im Agarosegel dient dank seiner fluoreszierenden Eigenschaften dazu, die DNA im Gel nach der Elektrophorese bei UV-Licht sichtbar zu machen, da es in der DNA interkaliert. Die Gele wurden je nach Probenvolumen

in einer Dicke zwischen 0,4cm und 0,8cm auf den Gelträger gegossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gel in die mit 1xTBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer eingelegt, so daß es ca. 1-2mm dick mit Flüssigkeit bedeckt war.

10µl der PCR-/Restriktions-Produkte wurden zur Agarose-Gelelektrophorese mit 3µl Loading Dye Startpuffer (Fa. MBI Fermentas) vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Größenmarker diente der pUC Mix Marker 8 (Fa. MBI Fermentas).

Die Agarosegele wurden in der Horizontal-Elektrophoresekammer im Submarine-Verfahren für 45-75 Minuten ohne Pufferkühlung einer Spannung von 8-12V/cm ausgesetzt.

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde unter dem UV-Schirm bei Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht und mittels einer Kamera auf einem Film dokumentiert.

### 2.3.7 Auswertung des Gentests

Der oben beschriebene HFE-Gentest ermöglicht es festzustellen, ob an den beiden in Nordeuropa wichtigsten Genloci (C282Y an Nukleotidposition 845 und H63D an Nukleotidposition 187) des HFE-Gens der Testperson eine Mutation vorliegt.

An Genlocus C282Y liegt normalerweise eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Rsa I* vor. Durch die HFE-Genmutation entsteht eine weitere Schnittstelle, dadurch ist es in der Agarose-Gelelektrophorese möglich, die Mutation zu identifizieren (siehe Abbildungen 3/4).

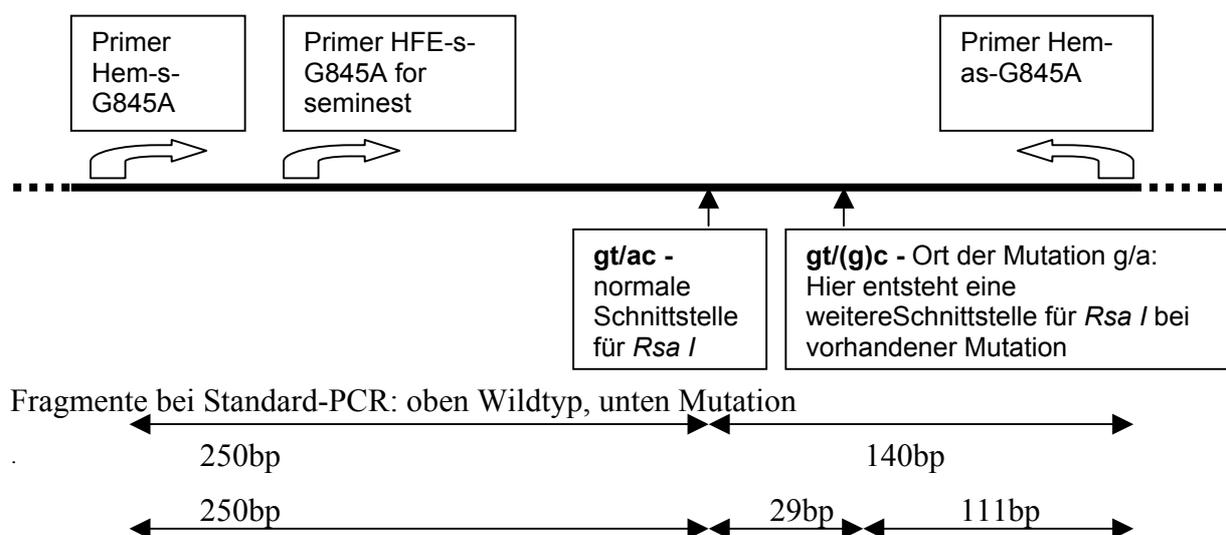


Abbildung 3: Schematischer Ausschnitt aus dem HFE-Gen bei Genlocus C282Y

Durch die Schnitte des Restriktionsenzym im Verdau entstehen typische DNA-Fragmente, die man bei der Agarose- Gelelektrophorese sichtbar machen kann.

Tabelle 2: Typische menschliche DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *Rsa I*, je nach HFE-Genstatus (nach Standard-PCR; Semಿನested-PCR analog)

	Wildtyp	Mutante	Heterozygot
DNA-Fragmente nach Restriktion mit <i>Rsa I</i> (Länge in Basenpaaren=bp)	250 bp	250 bp	250 bp
	140 bp	-	140 bp
	-	111 bp	111 bp
	-	29 bp	29 bp

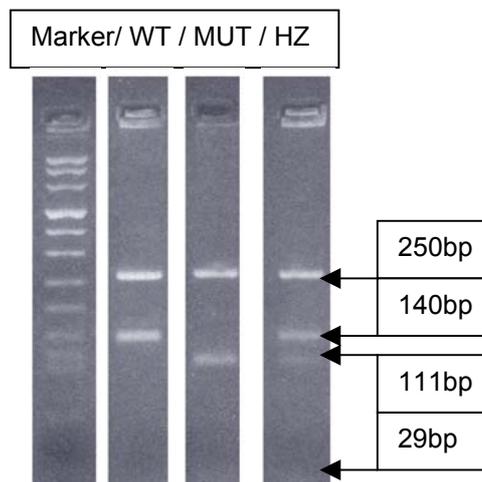


Abbildung 4: Typische Banden der DNA-Fragmente für C282Y nach Restriktionsverdau der Standard-PCR mit *Rsa I* im Agarosegel (von links: pUC 8-Mix-Marker/ Wildtyp/ Mutante/ Heterozygot)

An Genlocus H63D verhält es sich mit der Schnittstelle für das verwendete Restriktionsenzym *Mbo I* etwas anders. Die beim Wildtyp vorhandene Schnittstelle verschwindet bei Vorliegen der Mutation. Auch hier kommt es bei heterozygoter Merkmalsausprägung zu einem Nebeneinander der Wildtyp- und Mutanteausprägung in der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abbildungen 5/6).

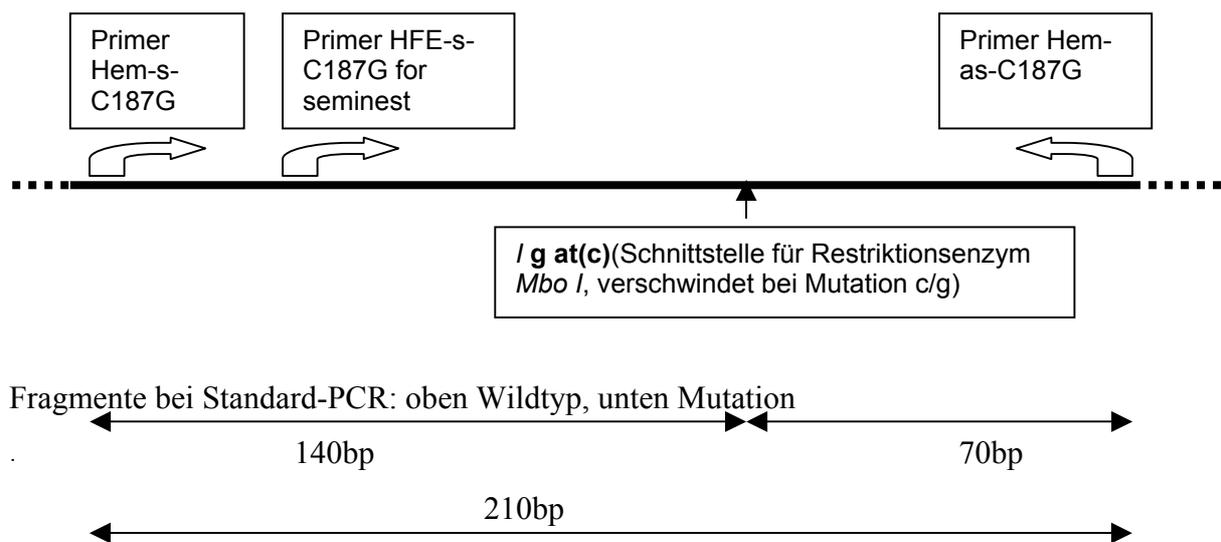


Abbildung 5: Schematischer Ausschnitt aus dem HFE-Gen bei Genlocus H63D

Tabelle 3: Typische menschliche DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *Mbo I*, je nach HFE-Genstatus (nach Standard-PCR; Seminest-PCR analog).

	Wildtyp	Mutante	Heterozygot
DNA-Fragmente nach Restriktion mit <i>Mbo I</i> (Länge in Basenpaaren=bp)	-	210 bp	210 bp
	140 bp	-	140 bp
	70 bp	-	70 bp

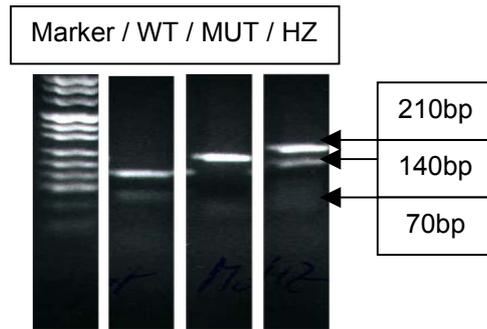


Abbildung 6: Typische Banden der DNA-Fragmente für H63D im Agarosegel nach Restriktionsverdau der Standard-PCR mit *Mbo I* (von links pUC8-Mix-Marker/ Wildtyp/ Mutante/ Heterozygot)

### 2.3.8 Statistik

Zur Erstellung der Statistik wurde das Programm SPSS 10.1 für Windows der Fa. SPSS (München) verwendet.

Zum Einsatz kamen der exakte T-Test nach Fischer und der Chi-Quadrat-Test sowie eine Multivarianzanalyse mittels binär logistischer Regression. Als signifikant wurde ein  $p < 0,05$  angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchte Personen und Geschlechterverteilung

In der Studie wurden insgesamt 608 Personen hinsichtlich Ihres HFE-Genstatus, ihrer klinischen und serologischen Parameter untersucht. 318 Personen waren HCV-positiv und 290 Personen gehörten der HCV-negativen, gesunden Kontrollgruppe an. Allen HCV-Patienten wurde eine Leberbiopsie entnommen. Die Patienten rekrutieren sich aus dem Patientengut der Hepatitisambulanz der Uniklinik Düsseldorf der Jahre 1996-2003. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Klinikmitarbeitern, deren Angehörigen und gesunden Erstblutspendern zusammen. Von insgesamt 608 untersuchten Personen waren 289 Frauen (47,5%) und 319 Männer (52,5%). In der Patientengruppe waren 196 Männer und 122 Frauen und in der HCV-negativen Kontrollgruppe fanden sich 123 Männer und 167 Frauen.

Es wurden insgesamt 6 Gruppen gebildet, 4 Gruppen mit Fibrosescore F0-F4, eine Gruppe der Patienten mit HCC und die gesunde Kontrollgruppe. In der Gruppe mit Fibrosescore F4 (=Zirrhose) wurde darauf geachtet, keine Patienten mit HCC einzuordnen, diese wurden in der 5. Gruppe gesondert aufgeführt. Eine einzige Patientin aus der 5. Gruppe hatte ein HCC ohne vorher an Leberzirrhose gelitten zu haben.

Tabelle 4: Geschlechterverteilung in den untersuchten Gruppen  
(F0 – F4 =Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose)

Gruppen	Frauen		Männer	
	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>F 0</b>	19	59,4	13	40,6
<b>F 1</b>	30	35,3	55	64,7
<b>F 3</b>	11	28,9	27	71,1
<b>F 4, ohne HCC</b>	47	37,9	77	62,1
<b>HCC</b>	15	38,5	24	61,5
<b>Gesunde Kontrollgruppe</b>	167	57,6	123	42,4

### 3.2 Altersstruktur der Patienten und Erkrankungsdauer

Das Alter der 608 untersuchten Personen betrug im Mittel 45 Jahre und die mittlere Krankheitsdauer bei den HCV-positiven Patienten betrug 14,3 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 16 Jahre alt, der älteste Patient 86 Jahre alt.

Zur genaueren Subgruppenanalyse wurden die Mittelwerte des Patientenalters mit dem Fibrosescore korreliert.

Tabelle 5: Übersicht über mittleres Alter und Erkrankungsdauer in den untersuchten Gruppen (F0 –F4 = Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose)

<b>Gruppe</b>	<b>Statistik</b>	<b>Alter</b>	<b>Erkrankungs- dauer</b>
<b>F 0</b>	Patientenanzahl	32	29
	<b>Mittelwert</b>	<b>39,72</b>	<b>9,90</b>
	Standardabweichung	11,35	7,26
	Minimum	16,00	1,00
	Maximum	64,00	31,00
<b>F 1</b>	Patientenanzahl	85	76
	<b>Mittelwert</b>	<b>43,87</b>	<b>12,54</b>
	Standardabweichung	12,53	11,13
	Minimum	19,00	1,00
	Maximum	71,00	51,00
<b>F 3</b>	Patientenanzahl	38	32
	<b>Mittelwert</b>	<b>47,89</b>	<b>14,00</b>
	Standardabweichung	12,51	8,41
	Minimum	27,00	3,00
	Maximum	81,00	35,00
<b>F 4, ohne HCC</b>	Patientenanzahl	124	95
	<b>Mittelwert</b>	<b>55,52</b>	<b>16,19</b>
	Standardabweichung	12,30	9,07
	Minimum	18,00	3,00
	Maximum	84,00	39,00
<b>HCC</b>	Patientenanzahl	39	33
	<b>Mittelwert</b>	<b>65,64</b>	<b>17,18</b>
	Standardabweichung	8,77	11,77
	Minimum	51,00	4,00
	Maximum	86,00	48,00
<b>Gesunde Kontrollgruppe</b>	Patientenanzahl	290	
	<b>Mittelwert</b>	<b>37,38</b>	
	Standardabweichung	16,19	
	Minimum	18,00	
	Maximum	86,00	
<b>Insgesamt</b>	Patientenanzahl	608	265
	<b>Mittelwert</b>	<b>44,59</b>	<b>14,31</b>
	Standardabweichung	16,67	10,03
	Minimum	16,00	1,00
	Maximum	86,00	51,00

### 3.3 Analyse des Einflusses der HFE-Mutation auf die Erkrankungsdauer

Im Vergleich in Tabelle 6 wurde die Gruppe der HCV-positiven Patienten mit HFE-Mutation mit der Gruppe der Patienten ohne HFE-Mutation bezüglich der mittleren Erkrankungsdauer verglichen. Die Erkrankungsdauer ist bei den Patienten mit HFE-Mutation kürzer. Eine statistisch eindeutige Signifikanz beim Vergleich der mittleren Erkrankungsdauern ließ sich anhand der vorliegenden Daten nicht nachweisen. Leider lagen nur bei 265 der 318 Patienten genaue Daten zum Erkrankungsbeginn vor, so daß nur für diese Patienten die Erkrankungsdauer ermittelt werden konnte.

Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte der Patienten *mit HFE-Mutation vs. ohne HFE-Mutation* bezüglich der mittleren Erkrankungsdauer

<b>Mutation</b>	<b>Patientenanzahl</b>	<b>Mittelwert für die Erkrankungsdauer</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Nein</b>	160	<b>15,16 Jahre</b>	10,48 Jahre
<b>Ja</b>	105	<b>13,03 Jahre</b>	9,18 Jahre

### 3.4 Klinische Parameter

Folgende Parameter wurden bei den untersuchten Personen ermittelt:

Das Alter bei Punktion und die Eisenparameter (Serumeisen, Ferritin, Transferrinsättigung).

In der Gruppe der HCV-positiven Patienten wurden zusätzlich die Erkrankungsdauer bzw. der höchstwahrscheinliche Zeitpunkt der HCV-Infektion, die Leberwerte (GOT, GPT, GGT), das Bilirubin, das Albumin sowie das alpha-Fetoprotein, der Quick-Wert und der Scheuer-Score zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ermittelt. Der HAI-Score (histologischer Aktivitätsindex, mit Fibrosescore) konnte leider nur bei insgesamt 178 der 318 der HCV-positiven Patienten ermittelt werden, da zwar alle Befunde der Leberpunktionen aller Patienten vorlagen, aber nicht alle der zum Teil extern gewonnenen Präparate dem hiesigen Pathologen zur Beurteilung vorgelegt werden konnten.

Eine vergleichende Gesamtübersicht der klinischen Parameter ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Mittelwerte der klinischen Parameter

(F0 –F4 = Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose, N = Anzahl der untersuchten Personen, STW = Standardabweichung)

Gruppe	Statistik	GOT [U/l]	GPT [U/l]	GGT [U/l]	Bilirubin [mg/dl]	Albumin [g/dl]	AFP [µg/l]	Quick [%]	Serum- eisen [µg/dl]	Ferritin [µg/l]	Trans- ferrin- sättigung [%]	Scheuer- Score
F 0	N	32	32	32	32	32	32	31	32	32	27	22
	<b>Mittelwert</b>	<b>9,9</b>	<b>34,8</b>	<b>24,7</b>	<b>0,6</b>	<b>5,0</b>	<b>4,4</b>	<b>105,5</b>	<b>129,5</b>	<b>122,5</b>	<b>30,9</b>	<b>0,1</b>
	STW	16,6	31,9	20,2	0,2	0,3	4,0	20,2	49,8	113,4	11,6	0,5
	Minimum	8,0	6,0	5,0	0,2	4,2	1,2	12,0	25,0	11,0	10,2	0,0
	Maximum	81,0	180,0	83,0	1,1	5,7	22,1	135,0	242,0	479,0	52,0	2,0
	<b>Median</b>	<b>15,5</b>	<b>26,0</b>	<b>18,0</b>	<b>0,5</b>	<b>5,0</b>	<b>3,5</b>	<b>108,0</b>	<b>123,0</b>	<b>79,0</b>	<b>32,9</b>	<b>0,0</b>
F 1	N	85	85	85	85	85	82	84	81	85	79	68
	<b>Mittelwert</b>	<b>26,0</b>	<b>48,0</b>	<b>31,9</b>	<b>0,7</b>	<b>4,8</b>	<b>6,0</b>	<b>106,9</b>	<b>118,5</b>	<b>232,7</b>	<b>33,7</b>	<b>0,1</b>
	STW	17,0	40,9	31,4	1,0	0,4	19,1	9,6	44,7	260,2	14,5	0,4
	Minimum	6,0	6,0	4,0	0,2	3,8	0,9	87,0	26,0	9,0	7,3	0,0
	Maximum	108,0	302,0	189,0	9,7	5,5	176,0	126,0	236,0	1270,0	89,8	2,0
	<b>Median</b>	<b>24,0</b>	<b>40,0</b>	<b>20,0</b>	<b>0,6</b>	<b>4,8</b>	<b>3,6</b>	<b>106,0</b>	<b>109,0</b>	<b>137,0</b>	<b>31,9</b>	<b>0,0</b>
F 3	N	38	38	38	38	37	35	38	35	38	35	33
	<b>Mittelwert</b>	<b>64,1</b>	<b>101,2</b>	<b>72,9</b>	<b>0,7</b>	<b>4,8</b>	<b>9,8</b>	<b>105,8</b>	<b>167,2</b>	<b>400,6</b>	<b>44,8</b>	<b>0,3</b>
	STW	46,6	62,9	61,9	0,3	0,7	22,3	9,5	69,4	441,3	18,2	0,6
	Minimum	15,0	15,0	9,0	0,3	1,0	1,5	86,0	46,0	24,0	12,0	0,0
	Maximum	227,0	302,0	305,0	1,4	5,5	136,1	128,0	302,0	2310,0	84,0	2,0
	<b>Median</b>	<b>54,5</b>	<b>85,0</b>	<b>48,0</b>	<b>0,6</b>	<b>4,9</b>	<b>5,5</b>	<b>106,5</b>	<b>159,0</b>	<b>244,5</b>	<b>40,0</b>	<b>0,0</b>
F 4, ohne HCC	N	123	123	123	121	113	110	122	102	113	87	42
	<b>Mittelwert</b>	<b>60,4</b>	<b>74,8</b>	<b>73,7</b>	<b>1,4</b>	<b>4,4</b>	<b>31,3</b>	<b>89,8</b>	<b>154,4</b>	<b>428,4</b>	<b>44,2</b>	<b>0,5</b>
	STW	65,1	72,0	67,2	2,6	0,6	97,2	15,3	67,7	460,8	23,5	0,7
	Minimum	5,0	5,0	10,0	0,3	2,5	0,9	32,0	10,0	6,0	3,9	0,0
	Maximum	596,0	538,0	380,0	27,2	5,6	715,6	122,0	383,0	2690,0	117,0	3,0
	<b>Median</b>	<b>41,0</b>	<b>54,0</b>	<b>53,0</b>	<b>0,9</b>	<b>4,5</b>	<b>8,5</b>	<b>92,0</b>	<b>149,5</b>	<b>253,0</b>	<b>38,0</b>	<b>0,0</b>

Gruppe	Statistik	GOT [U/l]	GPT [U/l]	GGT [U/l]	Bilirubin [mg/dl]	Albumin [g/dl]	AFP [µg/l]	Quick [%]	Serum- eisen [µg/dl]	Ferritin [µg/l]	Trans- ferrin- sättigung [%]	Scheuer- Score
<b>HCC</b>	N	39	39	38	39	36	34	39	18	37	18	8
	<b>Mittelwert</b>	<b>58,4</b>	<b>57,1</b>	<b>126,6</b>	<b>2,0</b>	<b>3,8</b>	<b>324,1</b>	<b>86,4</b>	<b>131,9</b>	<b>373,5</b>	<b>42,3</b>	<b>0,6</b>
	STW	32,9	36,2	115,7	2,3	0,6	882,1	20,3	71,7	366,4	22,9	0,7
	Minimum	20,0	7,0	0,7	0,2	2,0	1,2	16,0	20,0	20,0	9,0	0,0
	Maximum	158,0	177,0	651,0	12,4	4,8	5024,0	114,0	264,0	1550,0	90,0	2,0
	<b>Median</b>	<b>51,0</b>	<b>48,0</b>	<b>96,0</b>	<b>1,2</b>	<b>3,7</b>	<b>38,8</b>	<b>90,0</b>	<b>140,0</b>	<b>218,0</b>	<b>36,5</b>	<b>0,5</b>
<b>Gesunde Kontroll- gruppe</b>	N								270	271	270	
	<b>Mittelwert</b>								<b>103,3</b>	<b>86,8</b>	<b>29,0</b>	
	STW								207,3	137,6	14,3	
	Minimum								13,0	0,0	3,3	
	Maximum								3434,0	1670,0	92,0	
	<b>Median</b>								<b>87,5</b>	<b>47,2</b>	<b>27,1</b>	

In der folgenden Tabelle 8 wurden die Eisenparameter der Patienten ohne HFE-Gen-Mutation mit den Eisenparametern der Patienten mit HFE-Gen-Mutation verglichen. Als Bluteisenparameter wurden Serum-Eisen, Ferritin und die Transferrinsättigung bestimmt.

Als histologischer Eisenparameter wurde der vom Pathologen ermittelte Scheuer-Score verwendet.

Im T-Test für die Mittelwerte der Eisenparameter im Vergleich fanden sich signifikant höhere Werte für Serum-Eisen, Ferritin, Transferrinsättigung und den histologischen Scheuer-Score bei Patienten mit HFE-Mutation;  $p < 0,05$  \*.

Tabelle 8: Vergleich der Eisenparameter der HCV-positiven Patienten  
*Patienten mit HFE-Mutation (=1) vs. Patienten ohne HFE-Mutation (=0)*  
 (ohne Patienten mit gesicherter Hämochromatose).

<b>Parameter</b>	<b>Mutation</b>	<b>Anzahl der untersuchten Personen</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Signifikanz (2-seitig) *</b>
<b>Serumeisen</b>	0	332	109,02	553,87	<b>0,01</b>
	1	206	<b>142,78</b>	238,78	
<b>Ferritin</b>	0	353	192,80	298,07	<b>0,03</b>
	1	222	<b>254,39</b>	353,47	
<b>Transferrin-sättigung</b>	0	316	31,66	16,49	<b>0,001</b>
	1	199	<b>37,54</b>	19,42	
<b>Scheuer-Score</b>	0	111	0,15	0,41	<b>0,001</b>
	1	61	<b>0,49</b>	0,76	

### 3.5 Mutationshäufigkeit in den untersuchten Personengruppen

Die Häufigkeit des Vorliegens einer Mutation C282Y oder H63D an den Nukleotidpositionen 845 und 187 des Hämochromatosegens wurde in Abhängigkeit vom Fibrosescore bestimmt.

Da die Patientenanzahlen N in den jeweiligen Gruppen differierten, wurden zum besseren Vergleich die prozentualen Anteile ermittelt und mit in der Tabelle 9 aufgetragen.

Es zeigt sich ein Anstieg der Mutationshäufigkeit von F0 nach F4. Bei Vergleich der Gruppe mit milden Fibrosegraden F0 und F1 mit der Gruppe mit Patienten mit Zirrhose F4 sowie HCC ist die Mutationshäufigkeit bei den schwergradigen Leberveränderungen signifikant höher,  $p = 0,03^*$ .

Tabelle 9: Mutationshäufigkeit in den untersuchten Gruppen  
(F0 – F4 = Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose)

<b>Fibrosescore</b>	<b>Allel</b>	<b>N</b>	<b>Prozent</b>
<b>F 0</b>	Wildtyp	24	75,0%
	Mutante	8	<b>25,0%</b>
	Gesamtanzahl	32	100,0%
<b>F 1</b>	Wildtyp	56	65,9%
	Mutante	29	<b>34,1%</b>
	Gesamtanzahl	85	100,0%
<b>F 3</b>	Wildtyp	22	57,9%
	Mutante	16	<b>42,1%</b>
	Gesamtanzahl	38	100,0%
<b>F 4, ohne HCC</b>	Wildtyp	68	54,8%
	Mutante	56	<b>45,2%</b>
	Gesamtanzahl	124	100,0%
<b>HCC</b>	Wildtyp	19	48,7%
	Mutante	20	<b>51,3%</b>
	Gesamtanzahl	39	100,0%
<b>Gesunde Kontroll- gruppe</b>	Wildtyp	184	63,4%
	Mutante	106	<b>36,6%</b>
	Gesamtanzahl	290	100,0%

### 3.6 Allelhäufigkeiten in den untersuchten Gruppen

Es wurden die Allelhäufigkeiten für die zwei in Nordeuropa wichtigsten Hämochromatose-Gen-Mutationen (C282Y an Nukleotidposition 845 des HFE-Gens und H63D an Nukleotidposition 187 des HFE-Gens) in Abhängigkeit vom Fibrosescore ermittelt.

Die Häufigkeit des Allels mit C282Y-Mutation steigt mit dem Fibrosegrad – in der Gruppe der Patienten mit HCC fällt die Allelhäufigkeit wieder leicht ab.

Es zeigt sich eine signifikant höhere Allelfrequenz für die C282Y-Mutation bei den Gruppen mit schwerer Leberfibrose im Vergleich: *F0 + F1* vs. *F4 + HCC*;  $p < 0,05^{**}$ .

Tabelle 10: Allelhäufigkeiten für die Mutation an Nukleotidposition 845 (C282Y) (F0 – F4 = Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose)

<b>Fibrosescore</b>	<b>Allel</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>F 0</b>	Wildtyp	63	98,4
	Mutante	1	<b>1,6</b>
	Gesamtanzahl	64	100,0
<b>F 1</b>	Wildtyp	159	93,5
	Mutante	11	<b>6,5</b>
	Gesamtanzahl	170	100,0
<b>F 3</b>	Wildtyp	69	90,8
	Mutante	7	<b>9,2</b>
	Gesamtanzahl	76	100,0
<b>F 4, ohne HCC</b>	Wildtyp	222	89,5
	Mutante	26	<b>10,5</b>
	Gesamtanzahl	248	100,0
<b>HCC</b>	Wildtyp	71	91,0
	Mutante	7	<b>9,0</b>
	Gesamtanzahl	78	100,0
<b>Gesunde Kontroll- gruppe</b>	Wildtyp	540	93,1
	Mutante	40	<b>6,9</b>
	Gesamtanzahl	580	100,0

$p < 0,05^{**}$

Bei der Allelfrequenz des Allels mit der H63D-Mutation ist ein Anstieg mit steigendem Fibrosegrad bis hin zum HCC zu verzeichnen, die Gruppe der Fibrosepatienten (F3) fällt aus der aufsteigenden Reihe mit stark ansteigender Allelfrequenz heraus.

Statistisch signifikant höhere Allelfrequenzen finden sich für die H63D-Mutation in den Gruppen mit schwerer Leberfibrose beim Vergleich  $F0 + F1$  vs.  $F4 + HCC$ ;  $p < 0,01^{***}$ .

Tabelle 11: Allelhäufigkeiten für die Mutation an Nukleotidposition 187 (H63D)<sup>\*\*\*</sup>  
(F0 – F4 = Gruppen nach Fibrosescore, F4 = Zirrhose)

<b>Fibrosescore</b>	<b>Allel</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>F 0</b>	Wildtyp	57	89,1
	Mutante	7	<b>10,9</b>
	Gesamtanzahl	64	100,0
<b>F 1</b>	Wildtyp	151	88,8
	Mutante	19	<b>11,2</b>
	Gesamtanzahl	170	100,0
<b>F 3</b>	Wildtyp	64	84,2
	Mutante	12	<b>15,8</b>
	Gesamtanzahl	76	100,0
<b>F 4, ohne HCC</b>	Wildtyp	210	84,7
	Mutante	38	<b>15,3</b>
	Gesamtanzahl	248	100,0
<b>HCC</b>	Wildtyp	53	67,9
	Mutante	25	<b>32,1</b>
	Gesamtanzahl	78	100,0
<b>Gesunde Kontroll- gruppe</b>	Wildtyp	494	85,2
	Mutante	86	<b>14,8</b>
	Gesamtanzahl	580	100,0

### 3.7 Multivarianzanalysen

Bei der Multivarianzanalyse mittels binärer logistischer Regression kann festgestellt werden, mit welchem Gewicht mehrere verschiedene Faktoren die Ausprägung eines weiteren Faktors beeinflussen. Untersuchte Faktoren in vorliegender Multivarianzanalyse sind das Patientengeschlecht, die Erkrankungsdauer (kategorisiert größer und kleiner-gleich 12 Jahre) und das Vorhandensein einer HFE-Gen-Mutation allgemein sowie die einzelnen Mutationen an C282Y und H63D. Untersucht wird der relative Effekt auf die Ausbildung einer Leberzirrhose. In den Tabellen 12-14 werden die Patienten mit milder Fibrose (Gruppen mit Fibrosescore F0 und F1) mit den Patienten mit Leberzirrhose (Fibrosescore F4) und hepatozellulärem Karzinom (HCC) verglichen.

Tabelle 12: Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ HFE-Mutation generell* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen mit *milder Fibrose (F0-F1) vs. Zirrhose (F4) und HCC.*

Faktor	Signifikanz	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
	*			
<b>Geschlecht</b>	0,54	1,12	0,77	1,63
<b>Erkrankungs-dauer</b>	<b>0,001</b>	2,29	1,57	3,33
<b>HFE-Mutation generell</b>	<b>0,001</b>	2,88	1,95	4,24

\* (Signifikanz für HFE-Mutation in der Gruppe mit Leberzirrhose/HCC im Vergleich zu den Patienten mit milder Fibrose(F0-F1);  $p < 0,01$  und signifikante Erkrankungsdauer in den schwereren Krankheitsstadien im Vergleich;  $p < 0,01$ .)

Tabelle 13: Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ Heterozygoter(HZ) Mutation an C282Y* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen mit *milder Fibrose (F0-F1) vs. Zirrhose (F4) und HCC.*

Faktor	Signifikanz	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
	**			
<b>Geschlecht</b>	0,61	1,12	0,72	1,75
<b>Erkrankungs-dauer</b>	<b>0,001</b>	2,46	1,58	3,84
<b>HZ-Mutation an C282Y</b>	<b>0,001</b>	2,59	1,39	4,84

\*\* (Signifikant sind Erkrankungsdauer und C282Y-HZ-Mutation als Risikofaktoren bei den Patienten mit Zirrhose und HCC;  $p < 0,01$ .)

**Table 14:** Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ Heterozygoter(HZ) Mutation an H63D* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen mit *milder Fibrose (F0-F1) vs. Zirrhose (F4) und HCC*.

Faktor	Signifikanz ***	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Geschlecht</b>	0,85	1,04	0,69	1,56
<b>Erkrankungs- dauer</b>	<b>0,001</b>	2,12	1,42	3,16
<b>HZ-Mutation an H63D</b>	<b>0,001</b>	2,21	1,40	3,47

\*\*\* (Signifikant sind Erkrankungsdauer und H63D-Mutation als Risikofaktoren in der Gruppe mit Zirrhose und HCC;  $p < 0,01$ .)

Die Tabellen 15-17 zeigen den Vergleich der Patientengruppe mit Leberfibrose (Fibrosescore F0 - F3) mit den Patienten mit Leberzirrhose (Fibrosescore F4) bezüglich des relativen Gewichts der Faktoren Patientengeschlecht, Erkrankungsdauer und der jeweiligen Veränderung am HFE-Gen für die Entstehung einer Leberzirrhose.

**Table 15:** Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ HFE-Mutation generell* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen *Fibrose (F0-F3) vs. Zirrhose (F4)+HCC*.

Faktor	Signifikanz *	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Geschlecht</b>	0,84	0,97	0,68	1,37
<b>Erkrankungs- dauer</b>	<b>0,001</b>	2,01	1,43	2,83
<b>HFE-Mutation generell</b>	<b>0,001</b>	2,37	1,67	3,36

\* (Signifikant sind hier die Erkrankungsdauer ( $p < 0,01$ ) und die HFE-Mutation generell ( $p < 0,01$ ) als Risikofaktoren bei den Patienten mit Leberzirrhose und HCC.)

Tabelle 16: Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ Heterozygoter(HZ)-Mutation an C282Y* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen *Fibrose (F0-F3) vs. Zirrhose (F4)+HCC*.

Faktor	Signifikanz **	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Geschlecht</b>	0,96	0,99	0,65	1,51
<b>Erkrankungs- dauer</b>	<b>0,001</b>	2,23	1,47	3,37
<b>HZ-Mutation an C282Y</b>	<b>0,01</b>	2,26	1,27	4,00

\*\* (Signifikant sind hier die Erkrankungsdauer ( $p < 0,01$ ) und die HZ-Mutation an C282Y ( $p < 0,01$ ) als Risikofaktoren der Leberzirrhosebildung.)

Tabelle 17: Multivarianzanalyse bezüglich *Geschlecht/ Erkrankungsdauer/ Heterozygoter(HZ)-Mutation an H63D* als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Leberzirrhose. Vergleich der Gruppen *Fibrose (F0-F3) vs. Zirrhose (F4)+HCC*.

Faktor	Signifikanz ***	Odds ratio	95,0% Konfidenzintervall für die Odds ratio	
			Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Geschlecht</b>	0,72	0,93	0,64	1,36
<b>Erkrankungs- dauer</b>	<b>0,001</b>	2,14	1,48	3,11
<b>HZ-Mutation an H63D</b>	<b>0,001</b>	1,91	1,27	2,89

\*\*\* (Signifikant sind hier die Erkrankungsdauer ( $p < 0,01$ ) und die HFE-Mutation generell ( $p < 0,01$ ) als Risikofaktoren bei den Patienten mit Leberzirrhose und HCC.)

## **4. Diskussion**

Die chronische Hepatitis C ist eine Viruserkrankung, deren Verlauf hauptsächlich von der Ausbildung einer Leberzirrhose abhängt. Auf dem Boden einer Leberzirrhose entsteht in ca. 3-6% der Fälle pro Jahr ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) <sup>2</sup>.

Klinische Beobachtungen zeigen, daß nicht alle Patienten eine Leberzirrhose ausbilden. Diese Beobachtungen veranlaßten dazu, die Hintergründe der Progredienz der Hepatitis C zur Leberzirrhose näher zu untersuchen.

Bekannte Faktoren, die die Entstehung einer Leberzirrhose aus einer Fibrose fördern, sind das Alter des Patienten, die Erkrankungsdauer, das männliche Geschlecht und Koinfektionen sowie ein erhöhter Alkoholkonsum.

In vorliegender Untersuchung wurden ein erhöhter Alkoholkonsum sowie Koinfektionen von Beginn an bei der Patientenauswahl ausgeschlossen. Diese Faktoren sind unbestritten wichtige Ursachen bei der Entstehung einer Leberzirrhose, sie könnten aber weitere Faktoren, die bei den untersuchten Patienten mit Hepatitis C relevant sind in ihrem Effekt verschleiern.

Daß der Eisenstoffwechsel den Verlauf einer Hepatitis beeinflusst, wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben <sup>23, 24</sup>. Eine verstärkte Eisenakkumulation wurde als Kofaktor der nichtalkoholischen Steatohepatitis, der Porphyria cutanea tarda <sup>25</sup> und auch als Kofaktor der chronisch viralen Hepatitis angesehen <sup>26, 27</sup>.

Eine verstärkte Eisenakkumulation scheint auch das Ansprechen einer Hepatitis C auf eine Interferontherapie <sup>28</sup> zu verschlechtern. Es konnte gezeigt werden, daß eine Eisendepletion mittels Aderlaß einen positiven Effekt auf den Verlauf der Hepatitis C hat <sup>29</sup>. Die Viruselimination scheint sich dadurch nicht zu verbessern <sup>30</sup>. Kazikaki et al. konnten im Jahre 2000 an kultivierten Leberzellen sogar nachweisen, daß Eisen die Hepatitis C-Virusreplikation verstärkt <sup>31</sup>.

Es ist bis jetzt unklar, ob die oft bei HCV-positiven Patienten erhöhten Eisenparameter durch die Entzündung oder durch einen Zelluntergang verursacht werden, ob das Virus selbst auf den Eisenstoffwechsel einwirkt oder andere Ursachen wie z.B. HFE-Gen-Mutationen dafür verantwortlich sind.

Es stellt sich die Frage, welche Rolle der HFE-Genstatus als Kofaktor der Fibrose-/Zirrhoseentstehung spielt. Daher hat die vorliegende Dissertation insbesondere zum Ziel, die Prävalenz und die Rolle der untersuchten HFE-Mutationen C282Y und H63D bei Patienten mit Hepatitis C und Leberzirrhose zu untersuchen. Speziell sollte die Rolle der heterozygoten HFE-Gen-Mutationen geklärt werden.

Die zwei untersuchten HFE-Gen-Mutationen C282Y und H63D sind für die weiße, nordeuropäische Bevölkerung keltischer Abstammung die wichtigsten Mutationen des Hämochromatosegens<sup>39</sup>. Große Untersuchungsreihen in Afrika, Asien und Amerika zeigen, daß bei an Hämochromatose erkrankten Personen aus dem afro-amerikanischen, afrikanischen und asiatischen Kulturkreis diese Mutationen des HFE-Gens eine untergeordnete Rolle einzunehmen scheinen<sup>12, 13, 32, 33</sup>. Patienten aus diesem Kulturkreis wurden aus diesem Grunde nicht in unsere Untersuchungen eingeschlossen.

Die oben genannten Mutationen des HFE-Gens, die nach derzeitigem Wissensstand für eine vermehrte Eisenakkumulation verantwortlich sind, sind als Risikofaktoren für die Leberfibrose und Leberzirrhose bei Patienten mit Hepatitis C von Erhardt et al.<sup>34</sup>, Bonkovsky et al.<sup>24, 27</sup> und Fargion et al.<sup>25</sup> beschrieben worden. Andere Studien lassen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HFE-Gen-Mutationen, verstärkter Eisenakkumulation und einer verstärkten Leberzirrhosebildung erkennen – möglicherweise spielen in diesen Studien andere Effekte eine stärkere Rolle<sup>35, 36</sup>. So wurde zum Beispiel ein erhöhter Alkoholkonsum in der Studie von Kazemi-Shirazi et al.<sup>35</sup> zugelassen oder in der Studie von Thorburn et al.<sup>36</sup> lag das Patientenalter ca. 10 Jahre unter dem Durchschnitt der Patienten in der vorliegenden Untersuchung.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine deutlich erhöhte Eisenakkumulation bei den HCV-positiven Patienten mit HFE-Mutation nachgewiesen werden (siehe dazu Tabelle 8). Die Mittelwerte aller untersuchten Eisenparameter (Serum-Eisen, Ferritin, Transferrinsättigung und Scheuer-Score) waren bei den Patienten mit HFE-Mutation signifikant gegenüber den Patienten ohne HFE-Mutation erhöht<sup>37-39</sup>. Ein oft genannter Kritikpunkt gegenüber Ferritin als Parameter der Eisenakkumulation ist die klinisch beobachtete unspezifische Ferritinerhöhung bei Entzündungen oder malignen Erkrankungen.

Beim Vergleich der Serum-Eisenparameter in den einzelnen Gruppen fallen in der Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose gelegentlich Patienten mit niedrigen Eisenparametern auf – bei diesen Patienten ist möglicherweise ein symptomatischer Blutverlust durch gastrointestinale Blutungen wie z.B. Ösophagusvarizenblutungen vorausgegangen und für die niedrigen Eisenwerte verantwortlich. Patienten mit Zustand nach Bluttransfusionen oder wiederholte Blutspender wurden von Beginn an aus der Untersuchung herausgelassen.

Eine im Leberpräparat signifikant erhöhte Eisenakkumulation ließ sich bei histologischer Untersuchung und Klassifikation nach dem Scheuer-Score nachweisen. Alle untersuchten Patienten wurden erst nach histologisch gesicherter Fibrose/ Zirrhose bzw. HCC in die Untersuchung aufgenommen. Leider gelang es aber nicht, alle extern gewonnenen Präparate dem hiesigen Pathologen zur Beurteilung zur Verfügung zu stellen, so daß Scheuer-Score und HAI-Score nicht in allen Fällen zu ermitteln waren, obwohl Fibrose/ Zirrhose/ HCC histologisch gesichert waren.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Daten sprechen dafür, daß HFE-Gen-Mutationen und eine damit verbundene erhöhte Eisenakkumulation die Progression einer Leberfibrose zur Zirrhose beschleunigen:

Die Prävalenz der HFE-Mutationen im allgemeinen und auch die Allelfrequenzen der beiden untersuchten Mutationen C282Y und H63D waren bei den untersuchten Leberzirrhose-/HCC-Patienten im Vergleich mit den Patienten mit milden Fibrosen signifikant erhöht (siehe Tabellen 9-11). Die Mutationshäufigkeit stieg mit zunehmendem Fibrosegrad – d.h. je stärker die Leberveränderung, desto mehr HFE-Gen-Mutationen in der Gruppe.

In der vorliegenden Studie ließ sich dieser Zusammenhang nicht nur für die C282Y-Mutation, sondern auch für die H63D-Mutation nachweisen, dies geht einher mit den Ergebnissen von Martinelli et al.<sup>19</sup>. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Blanc et al.<sup>40</sup> und Lauret et al.<sup>16</sup>, die für die H63D-Mutation keinen Zusammenhang mit einer Eisenüberladung feststellen konnten.

In den vorliegenden Multivarianzanalysen (siehe Tabellen 12 und 15), die die Faktoren Geschlecht des Patienten, mittlere Erkrankungsdauer (kategorisiert  $\leq 12$  Jahre /  $> 12$  Jahre) und HFE-Mutation generell enthielten, konnte mittels binärer Regression statistisch nachgewiesen werden, daß die Erkrankungsdauer und die HFE-Gen-Mutation unabhängige Faktoren der Leberzirrhosebildung bei Patienten mit Hepatitis C sind. Das Geschlecht des Patienten konnte nicht als unabhängiger Parameter identifiziert werden.

Das Überwiegen des männlichen Geschlechts bei der Leberzirrhose scheint also von anderen Faktoren bestimmt zu sein. Zum Beispiel von einem erhöhten Alkoholkonsum der Männer <sup>41</sup> aber auch von einer erhöhten Eisenakkumulation der Männer <sup>42</sup>. Geschlechtsreife Frauen unterliegen im Gegensatz zu den Männern durch die regelmäßigen Menstruationsblutungen einem höheren natürlichen Eisenverlust.

In unseren Daten zur Geschlechterverteilung zeigt Tabelle 4 deutlich, daß der relative Männeranteil an den Fibrosepatienten mit dem Schweregrad von F0 (40,6%) bis F3 (71,1%) deutlich steigt. Bei den Patienten mit F4-Fibrose und HCC ist der Männeranteil mit ca.- 62% zwar auch deutlich höher, aber es ist gegen F3-Fibrose kein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Eine mögliche Ursache dafür liegt darin, daß die Patienten in diesen Gruppen im Schnitt die ältesten Patienten sind. Bei dieser Altersgruppe ist die generell kürzere Lebenserwartung der Männer ein Faktor, der ein weiteres Ansteigen des relativen Männeranteils begrenzt. Entgegengesetzt dazu verhält es sich mit dem Frauenanteil. In den Gruppen mit leichter Fibrose finden sich relativ mehr Frauen als in den Gruppen mit schwerer Leberfibrose.

Ein besonderes Interesse der vorliegenden Untersuchung galt der Frage, ob die beiden untersuchten HFE-Mutationen C282Y und H63D auch in der heterozygoten Ausprägung einen Einfluß auf die Krankheitsprogredienz haben oder ob eine davon wichtiger für die Progredienz der Leberveränderungen der Hepatitis C-Patienten ist <sup>43, 44</sup>. Die homozygote C282Y-Mutation liegt der hereditären Hämochromatose ursächlich zugrunde <sup>33</sup>, ein kleiner Teil der sog. Compound-Heterozygoten (Heterozygot für C282Y und H63D) kann auch an Hämochromatose erkranken <sup>45, 46</sup>. Eine H63D-Homozygotie scheint bei Gesunden keine pathogenetische Bedeutung zu haben <sup>9</sup>.

Die Tabellen 10 und 11 zeigen die Allelfrequenzen für C282Y und H63D in Abhängigkeit vom Fibrosegrad: Bei beiden Mutationen ist die Allelfrequenz im Vergleich der Fibrose-Gruppen F0+F1 vs. F4+HCC in der Gruppe mit der schwereren Erkrankung signifikant höher<sup>19</sup>. Die Allelfrequenz für C282Y ist am höchsten in der Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose (F4), bei der Mutation H63D ist die höchste Allelfrequenz in unserer Untersuchung bei der Patienten mit HCC zu finden.

Interessanterweise ist in vorliegender Studie sowohl die Häufigkeit der Mutationen an sich, wie auch die Allelfrequenz beider Mutationen in den Gruppen mit milder Leberfibrose (F0 und F1) sogar unter denen der gesunden Bevölkerung. Dies untermauert die Bedeutung der HFE-Mutationen für die Fibroseentstehung. Bisher liegen keine vergleichbaren Daten anderer Studien in Bezug auf die Allelfrequenz in Abhängigkeit vom Fibrosegrad vor.

Die HFE-Gen-Mutationen sind in der nordeuropäischen Bevölkerung häufig. Die Allelfrequenzen für die C282Y-Mutation liegen bei bis 10% und die Allelfrequenzen für die H63D-Mutation liegen bei bis 30%. Studien zur Verbreitung der Hämochromatose bei scheinbar gesunden amerikanischen Blutspendern führten bereits 1988 Edwards et al. durch<sup>43</sup>, nach der Entdeckung der HFE-Genmutationen folgten Studien von Merryweather-Clarke et al. 1997<sup>33, 47, 48</sup> zur globalen Prävalenz der HFE-Mutationen und Olynyk et al. 1999<sup>44</sup> zur Verbreitung der HFE-Genmutationen in der australischen Bevölkerung.

Nach den eigenen Daten für die deutsche Bevölkerung liegen die Allelfrequenzen für C282Y bei 6,9% und für H63D bei 14,8%. Die Prävalenz der HFE-Genmutationen ist unter den Patienten mit Hepatitis C und Leberzirrhose oder HCC gegenüber den Patienten mit milder Fibrose in vorliegender Untersuchung deutlich erhöht.

Die Multivarianzanalysen für die einzelnen Mutationen, jeweils im Vergleich der Gruppen F0+F1 vs. F4+HCC und F0-F3 vs. F4+HCC (Tabellen 13/14 und 16/17), zeigen deutlich, daß beide heterozygoten Mutationen, wie auch die Erkrankungsdauer, unabhängige Faktoren der Leberzirrhoseentstehung sind.

In beiden Gruppenvergleichen ist die heterozygote Mutation der wichtigste Faktor und Heterozygotie für C282Y ist bedeutsamer als Heterozygotie für H63D<sup>34</sup>.

Die mittlere Erkrankungsdauer und das durchschnittliche Alter der Patienten in den jeweiligen Gruppen sind in Tabelle 5 aufgeführt: Man erkennt deutlich den Anstieg von mittlerem Alter und durchschnittlicher Erkrankungsdauer von niedrigerem Schweregrad zu höherem Schweregrad – die Erkrankung verläuft also mit der Zeit progredient.

Die Rolle der HFE-Mutationen in Bezug auf das Alter der Patienten und die Erkrankungsdauer zeigt sich beim Vergleich der Patienten mit HFE-Mutation vs. Patienten ohne HFE-Mutation (Tabelle 6). Patienten mit HFE-Mutation haben im Durchschnitt eine um ca. 2 Jahre kürzere Krankheitsdauer als Patienten ohne HFE-Mutation. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Krankheit bei diesen Patienten schneller voranschreitet. Eine mögliche Ursache für die schnellere Krankheitsprogression könnte in einer erhöhten Eisenakkumulation der Patienten mit HFE-Mutation liegen (siehe oben).

Der Vergleich der klinischen Parameter in Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der gängigen Laborwerte in den jeweiligen Fibrose-/ Zirrhostadien. Die Leberwerte (GOT, GPT und GGT) verschlechtern sich im Schnitt mit wachsender Leberveränderung. Eindrucksvoll läßt sich dies an der GGT verfolgen. Mit jedem Schweregrad von der Fibrose-Gruppe F0 bis hin zum HCC steigt der mittlere GGT-Wert. Es ist bekannt, daß die GGT mit dem Alkoholabusus eines Patienten korreliert. Da Patienten mit Alkoholabusus von unseren Untersuchungen vorher ausgeschlossen wurden, scheint die GGT auch ein Verlaufsparemeter bei der Leberfibrose zu sein. Für die Parameter GOT und GPT kann man eine ähnliche Tendenz wie bei der GGT erkennen, sie scheinen jedoch für die Leberfibrose unspezifischer zu sein.

Patienten der Fibrosegruppe F3 weisen vergleichsweise hohe Leberparameter und Eisenparameter auf (siehe Tabelle 7). Eine Erklärung für die Abweichung dieser Gruppe kann sein, daß die sonographisch unterstützte Leberpunktion nur einen Teil der gesamten Leberveränderung erfaßt. Es ist daher nicht auszuschließen, daß Fehleinschätzungen im Fibrosegrad vorlagen. Der Abfall der Eisenparameter bei Patienten mit Fibrosegrad F4 (Leberzirrhose) kann auch durch Blutverluste im Rahmen von gastrointestinalen Blutungen bedingt sein, diese sind eine der häufigsten Komplikationen bei Patienten mit Leberzirrhose.

Ferner muß selbstverständlich auch die Größe der untersuchten Gruppe als unsicherer Faktor in Betracht gezogen werden – in vorliegender Untersuchungsreihe aus dem Patientengut der Hepatitisambulanz waren in Gruppe F3 nur 38 Patienten, bei dieser nur kleinen Zahl ist die Mittelwertverzerrung durch einzelne „Ausreißer“ noch bedeutsam.

Erwartungsgemäß steigt das Bilirubin mit der Erkrankungsschwere an, das Albumin fällt mit wachsender Erkrankungsschwere ab und der Quick-Wert ist bei den Patienten mit milder Fibrose höher als in den Gruppen mit Zirrhose oder HCC.

Der AFP-Wert, der ein verbreiteter Screeningparameter hinsichtlich der Ausbildung eines HCC ist, steigt im Mittel kontinuierlich mit dem Fibrosegrad. Ein sprunghafter Anstieg um ca. Faktor 10 ist von Gruppe F4 (Zirrhose) zur Gruppe mit HCC zu verzeichnen.

Ein leicht über den Referenzwert erhöhtes AFP ist bei Patienten mit Hepatitis C regelmäßig zu beobachten, Werte über 20-30µg/l sollten wegen Verdachts auf ein HCC diagnostisch abgeklärt werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß in einer Studie von Erhardt et al. <sup>49</sup> ca. 20 % der Patienten mit HCC keine AFP-Erhöhung aufwiesen. Die Verlässlichkeit dieses häufig verwendeten Parameters ist im Einzelfall also fraglich.

Auch der Scheuer-Score <sup>22</sup>, der histologische Parameter, der mit in Tabelle 7 aufgeführt ist, wie auch der HAI-Score nach Knodell <sup>21</sup>, steigen mit dem Schweregrad der Erkrankung an. Diese Werte wurden von einem unabhängigen Pathologen ohne Kenntnis der genetischen und klinischen Parameter erhoben.

Unter Berücksichtigung all der genannten Ergebnisse unserer Untersuchung kann die zentrale Frage nach der Prävalenz und der Bedeutung der HFE-Gen-Mutationen bei Patienten mit Hepatitis C und Leberzirrhose folgendermaßen beantwortet werden:

1. Die Prävalenz der Mutationen im Allgemeinen, wie auch die Allelfrequenzen der C282Y-Mutation und der H63D-Mutation steigen mit dem Schweregrad der Lebererkrankung – dies ist möglicherweise ein Zeichen für den Einfluß der HFE-Mutationen auf die Krankheitsprogression.
2. Die HFE-Mutationen haben in der Multivarianzanalyse unter den weiteren Faktoren Geschlecht des Patienten und Erkrankungsdauer die größte Bedeutung bei der Bildung einer Leberzirrhose bei Patienten mit Hepatitis C.  
Die Erkrankungsdauer und die heterozygoten HFE-Mutationen sind signifikante, unabhängige Faktoren der Leberzirrhoseentstehung.  
Das Geschlecht des Patienten ist kein signifikanter unabhängiger Faktor in vorliegender Studie und hängt wahrscheinlich von weiteren Faktoren ab, wie z.B. dem Alkoholkonsum oder erhöhter Eisenakkumulation.
3. Die HCV-positiven Patienten mit HFE-Mutationen haben signifikant höhere Eisenwerte und eine schnellere Erkrankungsprogression im Vergleich mit Patienten ohne HFE-Mutation - dies ist ein weiterer Hinweis für die wichtige Rolle der HFE-Mutationen bei der Progression der Leberschädigung bei einer Hepatitis C.

Das Resümee dieser Untersuchung für die Praxis sollte sein, daß bei allen Patienten mit Hepatitis C die Eisenparameter und bei den Patienten mit nordeuropäischer (keltischer) Abstammung und erhöhten Serumeisenparametern auch der HFE-Genstatus in Bezug auf C282Y- und H63D-Mutationen routinemäßig bestimmt werden sollten, um Patienten mit hohem Leberzirrhoserisiko frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls mittels Eisenentzug behandeln zu können.

Hintergrund für weitere Studien könnte der genaue Mechanismus der Leberschädigung durch Eisenüberladung und auch der Einfluß der Eisenentzugsbehandlung auf den Krankheitsverlauf bei Patienten mit Hepatitis C sein.

## **5. Zusammenfassung**

Die Hepatitis C ist eine Erkrankung, die in ihrer Prognose vornehmlich durch die Entwicklung einer Leberfibrose/-zirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) bestimmt wird. Die Progredienz der chronischen Hepatitis C zu Zirrhose und HCC hängt von verschiedenen Faktoren ab, möglicherweise auch von einer verstärkten Eisenakkumulation.

In dieser Untersuchung wird die Prävalenz und die Bedeutung der HFE-Mutationen C282Y und H63D als (Ko-)Faktoren der Leberzirrhoseentstehung bei Hepatitis C untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei heterozygote HFE-Genträger.

C282Y und H63D sind bei nordeuropäischen Patienten, vor allem keltischer Abstammung, weit verbreitete Mutationen des Gens der hereditären Hämochromatose (HFE-Gens) auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr.6.

Zu diesem Zweck wurden 318 HCV-positive Patienten der Hepatitisambulanz der Uniklinik Düsseldorf in verschiedenen Stadien der Lebererkrankung und 290 gesunde Kontrollen hinsichtlich ihrer klinischen Parameter, der laborchemischen Parameter, der Leberhistologie und des HFE-Genstatus untersucht.

Patienten mit HFE-Mutationen wiesen eine kürzere Erkrankungsdauer auf als Patienten ohne diese Mutationen. Die Eisenparameter waren bei Patienten mit der HFE-Mutation signifikant erhöht. In der Multivarianzanalyse stellten sich die HFE-Mutationen im Allgemeinen, insbesondere aber die heterozygoten Einzelmutationen C282Y und H63D und die Erkrankungsdauer als signifikante unabhängige Faktoren der Leberzirrhoseentstehung heraus. Im Vergleich mit Patientengeschlecht und Erkrankungsdauer waren die HFE-Mutationen der wichtigste Faktor für die Fibroseprogression. Für das männliche Geschlecht als Faktor der Fibroseprogression konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die verstärkte Leberzirrhosebildung bei Männern scheint von anderen Faktoren abzuhängen. Die Prävalenz der HFE-Mutationen C282Y und H63D sind bei den Patienten mit Leberzirrhose oder HCC signifikant gegenüber den Patienten mit keiner oder milder Fibrose erhöht.

Nach diesen Erkenntnissen sollten bei allen Patienten mit Hepatitis C die Eisenparameter routinemäßig untersucht werden und bei Patienten nordeuropäischer, keltischer Abstammung und erhöhten Serumeisenparametern der HFE-Genstatus in Bezug auf C282Y und H63D bestimmt werden, um die Patienten mit erhöhtem Leberzirrhoserisiko frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können.

## **6. Literatur**

1. Niederau C. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C. Practical recommendations and new developments. *Med Klin* 2001; 96:599-607.
2. Niederau C, Lange S, Heintges T, et al. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998; 28:1687-1695.
3. Niederau C. Treatment of chronic hepatitis C with pegylated alpha-interferons. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127:563-566.
4. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Haussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2002; 35:357-366.
5. Beckh K, Leberzirrhose. Hexal Lexikon Gastroenterologie, München 1995.
6. Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem* 2001; 47:1147-1156.
7. Dantas W. Hereditary hemochromatosis. *Rev Gastroenterol Peru* 2001; 21:42-55.
8. Erhardt A, Niederau C, Osman Y, Hassan M, Häussinger D. Demonstration of HFE polymorphism in German patients with hereditary hemochromatosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124:1448-1452.
9. Powell LW, Nathan Subramaniam V, Yapp TR. Haemochromatosis in the new millenium. *J Hepatol* 2000; 32 Suppl 1:48-62.
10. Britton RS, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathogenesis of hereditary hemochromatosis: genetics and beyond. *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13:68-79.
11. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Waalen J. Haematological effects of the C282Y HFE mutation in homozygous and heterozygous states among subjects of northern and southern European ancestry. *Br J Haematol* 2003; 120:887-893.

12. Shiono Y, Ikeda R, Hayashi H, et al. C282Y and H63D mutations in the HFE gene have no effect on iron overload disorders in Japan. *Intern Med* 2001; 40:852-856.
13. Tsui WM, Lam PW, Lee KC, et al. The C282Y mutation of the HFE gene is not found in Chinese haemochromatotic patients: multicentre retrospective study. *Hong Kong Med J* 2000; 6:153-158.
14. Pereira AC, Cuoco MA, Mota GF, et al. Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2001; 88:388-391.
15. Lonardo A, Neri P, Mascia MT, Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis masquerading as rheumatoid arthritis. *Ann Ital Med Int* 2001; 16:46-49.
16. Lauret E, Rodriguez M, Gonzalez S, et al. HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1016-1021.
17. Willis G, Wimperis JZ, Lonsdale R, et al. Incidence of liver disease in people with HFE mutations. *Gut* 2000; 46:401-404.
18. Dooley JS. Diagnosis and management of genetic haemochromatosis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15:277-293.
19. 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.
20. Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003; 124:318-236.
21. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31:241-246.
22. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13:372-374.

23. Farinati F, Cardin R, De Maria N, et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:449-456.
24. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:759-768.
25. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Fiorelli G. Iron and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2000; 14 Suppl D:89D-92D.
26. Laroussi N, Mosnier JF, Morel Y, Deugnier Y, Dumas O, Audigier JC. [Non alcoholic steatohepatitis: a multifactorial, frequent, paucysymptomatic liver disease with a fibrotic outcome]. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26:475-479.
27. Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K, et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2002; 37:848-854.
28. Distanto S, Bjoro K, Hellum KB, et al. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 2002; 22:269-275.
29. Yano M, Hayashi H, Wakusawa S, et al. Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:133-137.
30. Cagnoni C, Corsini F, Pancotti D, Carrara G. Effect of iron depletion on long-term response to interferon in patients with chronic hepatitis C with increased plasma iron without accumulation of liver iron. *Ann Ital Med Int* 2000; 15:132-138.
31. Kakizaki S, Takagi H, Horiguchi N, et al. Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. *Liver* 2000; 20:125-128.
32. Moodie SJ, Ang L, Stenner JM, et al. Testing for haemochromatosis in a liver clinic population: relationship between ethnic origin, HFE gene mutations, liver histology and serum iron markers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:223-229.
33. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997; 34:275-278.

34. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38:335-342.
35. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Doberberger T, et al. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 116:127-134.
36. 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.
37. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996; 335:1799-1805.
38. Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M, et al. Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig Dis Sci* 1994; 39:2656-2659.
39. Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102:2108-2113.
40. Blanc JF, De Ledinghen V, Bernard PH, et al. Increased incidence of HFE C282Y mutations in patients with iron overload and hepatocellular carcinoma developed in non-cirrhotic liver. *J Hepatol* 2000; 32:805-811.
41. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 2002; 122:281-289.
42. Piperno A, Vergani A, Malosio I, et al. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 1998; 28:1105-1109.
43. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, et al. A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:225-231.

44. Smith BC, Gorge J, Guzail MA, et al. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27:1695-1699.
45. Erhardt A, Niederau C, Osman Y, Häussinger D. Hereditary hemochromatosis--new developments after discovery of the HFE gene. *Z Gastroenterol* 1999; 37:1179-1185.
46. Hohler T, Leininger S, Kohler HH, Schirmacher P, Galle PR. Heterozygosity for the hemochromatosis gene in liver diseases--prevalence and effects on liver histology. *Liver* 2000; 20:482-486.
47. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988; 318:1355-1362.
48. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; 341:718-724.
49. Erhardt A, Theobald I, Petry W, et al. Hepatocellular carcinoma: rising incidence of hepatitis C virus-associated cases at a university clinic in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127:2665-2668.

## 7. Anhang

### Erkennungssequenzen der Primer und Restriktionschnittstellen von C282Y sowie H63D

#### (Ausschnitt aus dem HFE-Gen):

Erkennungssequenzen der Primer : *Kursiv*

Schnittstellen der Restriktionsenzyme : **Fett**

#### C282Y:

BASE COUNT 176 a 159 c 211 g 187 t

#### ORIGIN

1 ttttctgaaa agggatattc cttctctcaa cctatagaag gaagtgaag ttccagtctt  
61 *cctggcaagg gtaaacagat* cccctctcct catccttctt ctttctgtc aagtgcctcc  
121 ttgtggaag gtgacacatc atgtgacctc ttcagtgacc actctacggt gtcgggcctt  
181 gaactactac ccccagaaca tcaccatgaa gtggctgaag gataagcagc *caatggatgc*  
241 *caaggagttc gaacctaaag* acgtattgcc caatggggat *gggacctacc agggctggat*  
301 aaccttgct **gtaccccctg** gggaagagca gagatatacg tgccagggtg gcacccagg  
361 cctggatcag cccctcattg tgatctgggg tatgtgactg atgagagcca ggagctgaga  
421 aaatctattg *ggggttgaga ggagtgctg* aggagtaat tatggcagtg agatgaggat  
481 ctgctctttg ttagggggtg ggccgagggt ggcaatcaaa ggcttfaact tgcttttct  
541 gttttagagc cctcacgctc tggcaccta gtcattggag tcatcagtgg aattgctgtt  
601 tttgtgtca tctgttcat tggaattttg ttcataatat taaggaagag gcaggggtca  
661 agtgagtagg aacaaggggg aagtctctta gtacctctgc cccagggcac agtgggaaga  
721 ggggcagagg gga

#### H63D:

BASE COUNT 79429 a 56933 c 56466 g 76884 t

#### ORIGIN

74701 tgagttgatg caggtgtgtg gagcctcaac atcctgctcc cctcctacta *cacatggtta*  
74761 *aggcctgttg* ctctgtctcc aggtcacac tctctgact acctctcat gggtcctca  
74821 gagcaggacc ttggtcttc ctgtttgaa gctttgggct *acgtggatga ccagctgttc*  
74881 gtgttctatg **atcatgagag** tcgccgtgtg gagccccgaa ctccatgggt ttccagtaga  
74941 *attcaagcc agatgtggct* gcagctgagt cagagtctga aagggtggga tcacatgttc  
75001 actgttgact tctggactat tatggaaaat cacaaccaca gcaagggtat tggagaggg

## **8. Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. D. Häussinger, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich –Heine-Universität Düsseldorf für die Vergabe des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bei dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Erhardt für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung sowie für die unermüdliche Motivation bei dieser Arbeit und Fr. Dr. K. Hauck, die stets mit Ratschlägen und Laborerfahrung zur Seite stand.

Dank auch an alle wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeiter der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, der Stationen MX 1, ME 2 und ME 3, der Hepatitisambulanz, der Gastroenterologischen Ambulanz, des Zentrallabors der MNR-Klinik, der Archive, des Institutes für Pathologie, dort besonderen Dank an PD Dr. Sarbia, Dr. A. Donner und Fr. Huss.

Vielen Dank auch meiner Familie und meiner Frau Coretta, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Studiums sowie bei dieser Arbeit begleitet haben.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Mahmoud, Christian  
Straße: Vinhovenweg 11  
PLZ/Wohnort: 41564 Kaarst  
Geburtsdatum/-ort: 21.04.1974 in Ratingen  
Familienstand: Verheiratet mit Coretta Schilberg

### Schulbildung:

1980- 1984 Erich Kästner Grundschule in Ratingen  
1984- 1985 Dietrich Bonhoeffer Gymnasium in Ratingen  
1985- 1993 Städt.Gymnasium Hochdahl

### Wehrdienst/Zivildienst:

1993- 1994 Zivildienst in der Uniklinik Düsseldorf

### Studium:

1994- 1999 Studium der Humanmedizin in Düsseldorf  
Abschluß in Regelstudienzeit mit III.Staatsexamen am 06.11.2000,  
danach 1 praktisches Studiensemester *Zahnmedizin* (Uni Aachen).

### Praktisches Jahr:

1999-2000 Uniklinik Düsseldorf (Tertial Innere Medizin und Wahlfach MKG-Chirurgie)  
und Wolfson Medical Center , Tel Aviv–Israel (Tertial Chirurgie)

### AiP:

2001-2002 Allgemein- und Unfallchirurgie im EVK Mettmann

### Weiterbildung:

Notarzt/Anästhesie für 1 Jahr am EVK Mettmann, seit 01.09.2003 in der  
Fachweiterbildung zum Chirurgen