Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes

Auftreten des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptor-Gens bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Benedikt Sandelin

aus Pargas/Finnland

Promoviert am 25. März 2009

Dekan:	Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter
1. Berichterstatter:	Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. med. U. Töx

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistung erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegende Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 10. August 2008

Benedikt Sandelin

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. M. Odenthal von mir selbst mit Unterstüzung der medizinisch-technische Assistentin Frau Melanie Scheffler durchgeführt worden.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes möchte ich für die freundliche Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Margarete Odenthal für ihre sehr motivierende Einarbeitung, ihre geduldige und hilfreiche Vermittelung von Fachwissen und besonders für ihre engagierte und herzliche Betreuung meiner Arbeit danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Melanie Scheffler, Frau Stephanie Schievenbusch, Herrn Johannes Ray, sowie Herrn Ingo Strack für ihre Unterstüzung und Hilfsbereitschaft während meiner Arbeit am Institut.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Chronische Hepatitis nach Hepatitis C-Infektion	1
1.1.1	Beschreibung des Hepatitis C-Virus	1
1.1.2	Epidemiologie der chronischen Hepatitis C	2
1.1.3	Transmission des HCV	3
1.1.4	Klinik, Diagnostik und Therapie der chronischen HCV	3
1.1.5	Histopathologie der chronischen Hepatitis C	4
1.2	Die Entstehung einer chronischen Hepatitis bei Nicht-Alkoholischen Fettlebererkrankungen	6
1.2.1	Epidemiologie der NAFLD	6
1.2.2	Risikofaktoren der NAFLD	6
1.2.3	Klinik und Diagnostik der NAFLD	7
1.2.4	Therapie der NAFLD	8
1.2.5	Die Pathophysiologie von NAFLD	8
1.3	Mechanismen der Fibrogenese in der chronischen Hepatitis	9
1.3.1	Fibrogene Signale durch den Leptinrezeptor	10
1.3.2	Der Leptin-Rezeptor	10
1.3.3	Die Rolle des Leptinsignalweges in der Leberfibrose	12
1.4	Genetische Polymorphismen im Leptin- und Leptinrezeptorgen	12
1.4.1	Das Auftreten der Q223R Mutation	12
2	Aufgabenstellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Herstellung von Zielsequenzen als Kontrolle der SNP-Darstellung im Gen des Leptinrezeptors	16
3.1.1	Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*	16
3.1.2	Restriktion des Plasmids pBlueskript SK+	17
3.1.3	Dimerisierung von Oligonukleotiden	18
3.1.4	Ligation und Transformation in *E.coli*	19
3.1.4.1	Ligation des Oligonukleotiddimer in den p-Blueskript SK II-Vektor	19

3.1.4.2	Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen und Transformation des Ligationsansatzes	20
3.1.4.3	Transformation in *E.coli*	20
3.1.4.4	Identifizierung von Rekombinanten durch die Blau-Weiß Selektion	21
3.1.5	Sichtung der DH5-α Transformationskolonien für Rekombinanten	22
3.1.5.1	Minikultur und Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	22
3.1.5.2	Amplifikation des pBlueskript SK II Polylinkers durch PCR und anschließende Restriktion	22
3.1.5.3	Sequenzierung der Rekombinanten-DNA	24
3.2	Auftrennung von DNA durch Submaringelelektrophorese	24
3.3	Patientenmaterial	25
3.3.1	Probenkollektiv mit NAFLD/ AFLD	25
3.3.2	Probenkollektiv mit Hepatitis C	26
3.3.3	Kontrollgruppe	26
3.4	Real-Time-Polymerasekettenreaktion	26
3.4.1	Nachweis der Q223R-Mutation durch Real-Time-PCR	27
3.5	Statistische Auswertung	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Herstellung der Kontrollsequenzen	31
4.1.1	Etablierung der SNP-Analyse mit Hilfe der klonierten Kontroll-sequenzen und DNA aus Blutproben	32
4.1.2	Testreihen mit DNA aus Blutproben	36
4.2	Darstellung und Auftreten des Q223R-Polymorphismus des Leptin-rezeptors in dem Probandenkollektiv	37
4.3	Der Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors bei Patienten mit Nicht-Alkoholischen und Alkoholischen Fettlebererkrankungen	38
4.3.1	Auftreten der Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors bei Patienten mit einer Nicht-Alkoholischen Fettlebererkrankung	38
4.3.2	Auftreten des Q223R-Polymorphismus im Patientenkollektiv mit einer Alkoholischen Fettlebererkrankung	39
4.3.3	Auftreten des Q223R-Polymorphismus im Patientenkollektiv mit chronischer Hepatitis C-Infektion	40

4.4	Einfluss des Q223R-Polymorphismus auf den Entzündungsgrad, die Fibroseprogression und die Steatose bei Lebererkrankungen	41
4.4.1	Auftreten des Q223R-Polymorphismus im NAFLD Kollektiv in Abhängigkeit des Entzündungsgrades, der Fibroseprogression und der Steatose	41
4.4.2	Einfluss des Q223R-Polymorphismus auf den Entzündungsgrad, die Fibroseprogression und die Steatose bei AFLD	44
4.4.3	Einfluss des Q223R-Polymorphismus auf den Entzündungsgrad und die Fibroseprogression bei chronischer Hepatitis C	48
5	Diskussion	51
5.1	Verteilung der Genotypen und Allele des Q223R Leptinrezeptorgens in den Patientenkollektiven	51
5.2	Auftreten der Q223R-Genotypen und Allele des Leptinrezeptors bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen	53
5.3	Bedeutung der Allelvarianz für den Leptinsignalweg	57
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	62
8	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	71
9	Lebenslauf	73

1 Einleitung

Chronische Leberschädigungen viraler, toxischer, metabolischer und genetischer Ursache führen zur Leberfibrogenese. Die Hepatitis- C Infektion und Fettlebererkrankungen gehören zu den wichtigen Ursachen eines chronischen Verlaufes der Lebererkrankung.

1.1 Chronische Hepatitis nach Hepatitis C-Infektion

80-90% aller Hepatitis C-Infektionen verlaufen chronisch. Ein Drittel der chronischen Hepatitiden führen nach ca. 20-25 Jahren zu einer Leberzirrhose, die dann häufig in einem hepatozellulären Carzinom (HCC) mündet.

1.1.1 Beschreibung des Hepatitis C-Virus

Das Erbmaterial des Hepatitis C-Virus (HCV) konnte erstmalig im Jahre 1989 mit Hilfe gentechnischer Methoden nachgewiesen werden [15]. Es ist ein 45nm großes, behülltes RNA-Virus aus der Familie der Flaviviren. Das HCV-Einzelstrang-Genom besteht aus ca. 9600 Nukleotiden. Das HCV ist aus drei Strukturproteinen, dem Kapsidprotein (Core) und zwei Hüllproteinen (E1, E2) aufgebaut. Daneben besitzt es weitere Nicht-Strukturproteine [80]. Die Variabilität des HCV ist im Vergleich zu anderen einzelsträngigen RNA-Viren verhältnismäßig hoch. Das HCV wird in sechs Genotypen unterteilt, wobei 65-72% der Nukleotide einer Gruppe homolog sein müssen [94-96]. Diese Genotypen werden noch in 30 weitere Subtypen untergliedert (z.B. 1a, 1b, 1c). Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt des Virus.

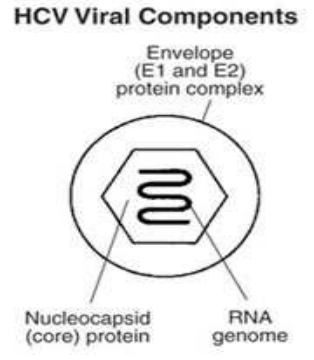


Abb. 1: Das Hepatitis C-Virus besteht aus einem Nukleokapsid (Core) und einer Lipidhülle, mit den Proteinkomplexen an der Membran verankert (übernommen von www.meds.com).

1.1.2 Epidemiologie der chronischen Hepatitis C

Mit dem Hepatitis C-Virus sind weltweit 170 Millionen Menschen chronisch infiziert [56]. Dies entspricht einer globalen Infektionsrate von ca. drei Prozent.

Die Prävalenz variiert allerdings zwischen den Kontinenten. In Afrika, dem östlichen Mittelmeerraum und dem Westpazifik ist sie signifikant höher als in Europa und Nordamerika. Schätzungen für Europa gehen von drei bis zu fünf Millionen HCV-infizierten Personen aus.

In Deutschland beträgt die Durchseuchungsrate 0,4 %. Bezogen auf die Gesamtbevölkerung entspricht dies ca. 275 000 Viruträgern [89].

Zudem ergeben sich große Differenzen in der HCV-Prävalenz des Untersuchungsklientels. Eine hohe Prävalenz des HCV findet man außer bei i.v.-Drogenabhängigen auch bei Dialysepatienten, Transplantierten und bei Patienten, die vor 1991 polytransfundiert wurden.

In Westeuropa, Süd- und Nordamerika sind die Genotypen 1 bis 3 weit verbreitet, während in Nord- und Zentralafrika Genotyp 4 und in Thailand und Vietnam Genotyp 6 dominant sind.

Bei den verschiedenen Geno- und Subtypen findet sich nicht nur eine bestimmte geographische Verteilung. Bestimmte Subtypen sind gehäuft in einigen Risikogruppen anzutreffen. So findet man vermehrt Genotyp 3a bei i.v.-Drogenabhängigen [68].

Tabelle 1: Prävalenz der Hepatitis C-Infektion

Hepatitis-C-Virus Prävalenz (Quelle: Weekly Epidemiological Record, Nr. 49 (1999), WHO)

WHO Region	Gesamt-population (Millionen)	Hepatits-C-Prävalenz (Rate %)	Infizierte Population (Millionen)	Zahl der Staaten (WHO-Reg.), in denen keine Daten vorlagen
Afrika	602	5,3	31,9	12
Amerika	785	1,7	13,1	7
Östlicher Mittelmeerraum	466	4,6	21,3	7
Europa	858	1,03	8,9	19
Südostasien	1500	2,15	32,3	3
Westpazifikregion	1600	3,9	62,2	11
Total	5811	3,1	169,7	57

1.1.3 Transmission des HCV

Die Frage der Transmissionswege ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Sicher sind aber der parenterale Weg, sowie der Weg über eine Bluttransfusion.
Die meisten Hepatitis C-Infektionen verlaufen anikterisch und führen zu einem chronischen Carrierstatus ohne das Bild einer akuten Hepatitis [2]. Auch wenn Patienten serologisch und histologisch das Bild einer akuten Hepatitis entwickeln, fehlt meist der Ikterus. Daher ist es oft schwer, sowohl den Infektionsweg als auch den Infektionszeitpunkt festzustellen.
Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, wie hoch das Risiko einer sexuellen Übertragung von HCV ist. In größeren Studienkollektiven wurden von Übertragungsraten von 1 bis 3% bei heterosexuellen Paaren in monogamer Beziehung berichtet [82]. In einer kanadischen Kohortenstudie mit homosexuellen Männern wurde festgestellt, dass bei gleichgeschlechtlichen Sexualkontakten das Übertragungsrisiko erhöht ist [56]. Das Risiko einer Übertragung ist jedoch kleiner als beim Hepatitis B-Virus.
Die Infektionsrate einer perinatalen HCV-Transmission auf das Kind liegt durchschnittlich bei ca. fünf Prozent und steigt bei höherer Virämie der Mutter. Bis heute konnte keine HCV-Übertragung durch die Muttermilch dokumentiert werden [106].

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie der chronischen HCV-Infektion

Da sowohl klinisch, enzymserologisch als auch histologisch meist die Zeichen einer akuten HCV-Infektion fehlen, wird eine chronische HCV-Infektion oft erst nach Jahren als Zufallsbefund entdeckt. Bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion entwickelt sich in ca. 30% der Fälle eine Zirrhose [41, 60, 109], die dann in ein hepatozelluläres Karzinom übergehen kann [60, 65, 66, 81].
Die Inkubationszeit einer HCV-Infektion liegt zwischen zwei und 24 Wochen. In der Regel vergehen ca. 6-9 Wochen, bevor eine Infektion nachgewiesen werden kann.
Erhöhte Transaminasen (GOT, GPT) und Gamma-Glutamyltransferase (γ-GT) können einen Hinweis auf eine chronische HCV-Infektion geben. Bei Verdacht kommen drei Tests zur Anwendung. Der HCV-ELISA ist ein sensitiver Sichtungstest, womit die Antikörper gegen das HCV nachgewiesen werden.

Ein positives HCV-ELISA-Ergebnis wird mit einer spezifischen Methode, wie z.B. dem Immunoblot, bestätigt. Sowohl die ELISA als auch der Immunoblot können nicht zwischen einer frischen, einer chronischer oder einer ausgeheilten HCV-Infektion unterscheiden. Zudem setzt die Antikörperbildung frühestens 4-6 Wochen nach der Infektion ein [57]. Mittels PCR kann Virus-RNA direkt im Serum nachgewiesen werden. Die Infektion kann durch die PCR bereits nachgewiesen werden, bevor Antikörper gegen das Virus gebildet wurden [57, 58].

Eine Indikation zur Therapie einer chronischen Hepatitis C-Infektion besteht bei Patienten, die positiv für HCV-RNA sind und eine histologische und/oder biochemische Entzündungsaktivität oder eine signifikante Fibrosierung aufzeigen. Bei Patienten mit positivem HCV-Test, die extrahepatische Komplikationen, wie symptomatische Kryoglobulinämie, Glomerulonephritis oder Vaskulitis zeigen, ist eine Therapie ebenfalls indiziert. Wenig erfolgversprechend ist eine Therapie bei Patienten, die neben positiver HCV-RNA normale Transaminasen und histologisch fehlende Entzündungsaktivität und Fibrosierung zeigen (zusammengefasst von Dollinger, M) [25].

Primäres Ziel der antiviralen Therapie ist die Elimination des HCV und die Ausheilung der chronischen Hepatitis, um die Krankheitsprogression zu verhindern. Weitere Ziele sind die Behandlung von extrahepatischen Manifestationen, die Beseitigung der Infektiösität, sowie eine Verbesserung der Lebensqualität.

Das Behandlungsschema der chronischen Hepatitis C ist eine Kombinationstherapie aus PEG-Interferon und Ribavarin. Bei Genotyp 1 erfolgt die Therapie über 48 Wochen, bei Genotyp 2 und 3 über 24 Wochen [25].

Pegylierte Interferone bestehen aus rekombinant hergestelltem Interferon–alpha, das an Polyethylenglykol gekoppelt ist. Dadurch werden eine verlängerte Halbwertzeit und eine erhöhte Substanzstabilität erreicht. Die Compliance kann verbessert werden, indem PEG-IFN nur ein Mal pro Woche gegeben wird [6].

1.1.5 Histopathologie der chronischen Hepatitis C

Die Leberbiopsie ist die wesentliche Maßnahme in der diagnostischen Abklärung einer chronischen Hepatitis C. Sie gilt daher als Goldstandard zur Evaluierung des Fortschritts der Erkrankung [87, 88].

Obwohl die histopathologische Untersuchung von außerordentlich hoher Relevanz ist, ist sie aufgrund von technischen Mängeln und der semiquantitativen Aussage der Einstufung des Entzündungsgrades (Grading) und der Fibrosestufe (Staging) auch limitiert. Das Fibrose-Staging beschreibt das Ausmaß der Umbauvorgänge in der Leber durch die Bewertung von Fibrose und die Zerstörung der Architektur (Ishak 1995). Sie wird in einem nach Desmet veränderten, diagnostischen Score festgehalten [87, 88].

Hierbei wird die Zerstörung in vier Stufen eingeteilt (S1-S4) (vgl. Abb. 2):
In Stadium 1 findet man eine geringe Fibrose mit ausschließlich portaler Faservermehrung.
In Stadium 2 ist die Fibrose mäßig und man findet eine portale Faservermehrung mit zarten und zum Teil inkompletten Septen.
Das Stadium 3 ist erkennbar durch schwergradige Fibrose mit portaler Faservermehrung, kompletter Septenbildung und Architekturzerstörung.
Schließlich findet man in Stadium 4 eine komplette Zirrhose (vgl. Abb.2) [87, 88].

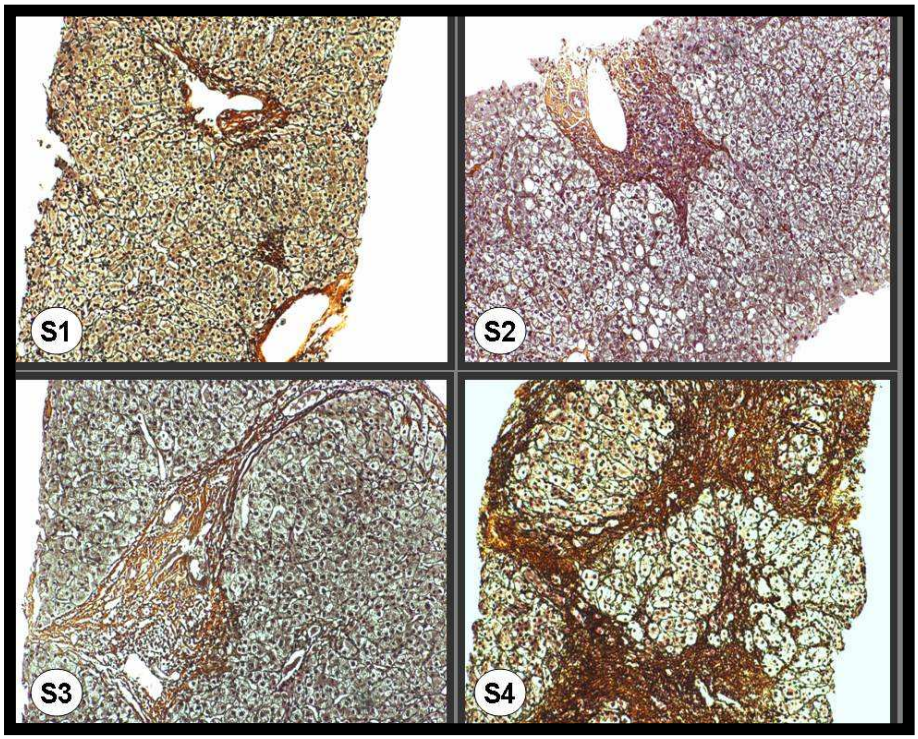


Abb. 2: Fibrosestadium S1-S4 bei chronischer Hepatitis C (die histologische Bilder wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Uta Drebber zur Verfügung gestellt)

Die Histologie der chronischen Hepatitis C ist häufig durch Fettablagerungen in unterschiedlichem Ausmaß gekennzeichnet. Die Steatosis der Leber ist dabei bei Infektionen des HCV-Genotyps 3 am stärksten [42].

1.2 Die Entstehung einer chronischen Hepatitis bei Nicht-Alkoholischen Fettlebererkrankungen

Die Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste Lebererkrankung in den westlichen Industrienationen. Sie ist eine stoffwechselbedingte Lebererkrankung, die häufig im Zusammenhang mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom auftritt. Bei steigender Prävalenz sind derzeit ca. 20% der Allgemeinbevölkerung betroffen (zusammengefasst von Dancygier, H)[19].

1.2.1 Epidemiologie der NAFLD

Die Prävalenz der NAFLD in der Bevölkerung wird auf 20% geschätzt. Sie geht in 2-3% der Fälle in eine Steatohepatitis über (NASH). Circa 5-10% der übergewichtigen (BMI > 25) und 20% der adipösen (BMI > 30) Menschen sollen ein NASH aufweisen. Die häufigste Ursache für ein NAFLD in den westlichen Ländern ist das metabolische Syndrom [5].

1.2.2 Risikofaktoren der NAFLD

Die Ursachen einer NAFLD können vielfältig sein. In den meisten Fällen weisen die Patienten eine Fettstoffwechselstörung, Übergewicht, einen Hypertonus, häufig auch eine Diabetes mellitus Typ 2 oder eine Insulinresistenz auf.
Auch Medikamente können eine Rolle bei der Entwicklung einer NASH spielen. Besonders sind das Antiarrhytmikum Amiodaron und Glucokortikoide zu erwähnen. In Einzelfällen wurden auch Antibiotika in Zusammenhang mit der Entwicklung einer NASH gebracht.
Andere Ursachen einer NASH können die operative Verkürzung des Dünndarms, eine Gastroplastik und selten angeborene Stoffwechselerkrankungen sein.

Tabelle 2: Ursachen einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (übernommen von Dancygier, H)[39]

Metabolisches Syndrom	Medikamente
abdominale Adipositas	Amiodaron
Triglyzeride≥150 mg/dl	Glucocorticoide
erniedrigte HDL	Tamoxifen
RR≥ 130/85 mm Hg	Nifedipin
Nüchtern-Blutzucker ≥110mg/dl	Chloroquin
	Synthetische Östrogene

Parenterale Ernährung	Verschiedenes
Diabetes mellitus Typ 2	Morbus Wilson
Magen-Darm-chirurgische Eingriffe	Weber-Christian-Krankheit
Jejunoilealer Bypass	A-β Lipoproteinämie
Ausgedehnte Dünndarmresektion	Lipodystrophie
Pankreatiko-Duodenektomie	Gliedmaßendystrophie
Gastroplastik	

1.2.3 Klinik und Diagnostik der NAFLD

Die meisten Patienten mit einer NAFLD weisen keine Symptome auf. Einige Patienten berichten jedoch über Mattigkeit und Druckschmerzhaftigkeit im rechten Oberbauch.
Die Patienten fallen meist im Rahmen einer Routineuntersuchung durch eine Erhöhung der Leberwerte auf. Die Transaminasen sind oft leicht bis mäßig erhöht.
Im Gegensatz zur ASH (Alkoholische Steatohepatitis) ist die Erhöhung der GPT größer als die der GOT [4, 29, 76]. So ist der GOT/GPT-Quotient bei NASH kleiner als 1, bei der ASH dagegen größer 1 [4, 24, 35, 74].
Zusätzlich finden sich nicht selten eine mittelgradig bis stark erhöhte γ-GT und eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase.
Eine alkoholische von einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung zu unterscheiden ist schwierig, weil sich die histologischen Läsionen bei NASH und bei alkoholischer Hepatitis gleichen. Daher ist eine ausführliche Anamnese des Alkoholkonsums von großer Bedeutung.
Hierbei kann die Ultraschalluntersuchung den Verdacht auf eine Leberverfettung bestärken. Die Leber lässt sich oft vergrößert und echoreicher als normal darstellen [77].
Durch eine Leberpunktion kann in der histologischen Untersuchung der prozentuale Anteil der verfetteten Hepatozyten und der Grad der Fibrosierung festgestellt werden.

Die Leberpunktion ist bis heute die einzige Methode, um die Progredienz einer Fibrose, und den Übergang zu einer Zirrhose feststellen zu können [51].

1.2.4 Therapie der NAFLD

Handelt es sich nur um eine Leberverfettung ohne entzündliche Komponente und Fibrose, ist eine Therapie im Regelfall nicht notwendig. Bei Übergewicht, erhöhtem Blutzucker und erhöhtem Triglyceridspiegel sind Maßnahmen indiziert, um diese Risikofaktoren für eine Progredienz auszuschalten.
Die Grundlage der Behandlung bei den meisten Patienten ist die Beeinflussung des metabolischen Syndroms. Eine langsame Gewichtsreduktion, körperliche Bewegung und die Einstellung des Blutzuckers gehören zur Therapie.
Eine zuverlässige pharmakologische Therapie steht zur Zeit nicht zu Verfügung.

1.2.5 Die Pathophysiologie von NAFLD

Die genaue Pathogenese der NAFLD ist ungeklärt. Warum es in einigen Fällen nur zur Fettleber kommt, und in anderen Fällen fibrotische und nekroinflammatorischen Veränderungen entstehen, ist nicht bekannt.
Viele Faktoren wie Insulinresistenz, Leberzellverfettung, Endotoxine, proinflammatorische Zytokine, oxidativer Stress und genetische Faktoren können zur Progression der NAFLD in eine NASH beitragen.
Nach der „two hit hypothese“ kann die Leberzellverfettung als erster Schlag auf dem Wege zu NASH aufgefasst werden [20]. Nach Day et al. erhöht die Leberzellverfettung die Empfindlichkeit gegenüber Mechanismen, die den nekroinflammatorischen Vorgang auslösen und unterhalten („zweiter Schlag“). Zu diesen zählen vor allem Endotoxine, oxidative Stress und genetische Faktoren [13, 26, 69, 79, 85].
Die im Rahmen der Steatosis frei anfallenden Fettsäuren, die durch die Lipolyse freigesetzt werden, verstärken die Lipidperoxidation. Sie generieren ROS (reaktive Sauerstoffspezies), führen zu einer erhöhten Freisetzung des inflammatorischen Faktors TNF-α und schädigen die Mitochondrien. Nekroinflammatorische und apoptotische Prozesse werden somit initiiert und unterhalten [30].

Zudem kommen strukturelle Veränderungen der Mitochondrien bei Patienten mit NASH vor. Diese führen zu einer gestörten ATP-Synthese, die ebenfalls an der hepatozellulären Schädigung beteiligt ist [72, 73, 85].
Neben der Lipidoxidation, dem hepatozellulären Untergang bewirkt die vermehrte Freisetzung von Endotoxinen eine zusätzliche Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch Kupffer-Zellen und von infiltrierenden Entzündungszellen, wie TNFα, Interleukin 6 und Interleukin 12. Die proinflammatorischen Zytokine generieren ebenfalls ROS, die zu oxidativem Stress der Hepatozyten durch die Peroxidation von Membranlipiden und zur DNA-Schädigung führt.
Die entzündlichen Mediatoren und die Zwischenprodukte der ROS stimulieren aber auch die Hepatischen Sternzellen (HSC), die durch die Matrixproduktion und ein verändertes Wachstumsfaktoren-Sekretionsprofil die Fibrogenese unterhalten [33].

1.3 Mechanismen der Fibrogenese in der chronischen Hepatitis

Im Rahmen der Leberfibrogenese kommt es zur Vermehrung und Umverteilung des Leberbindegewebes. Dabei entsteht ein verschobenes Gleichgewicht zwischen einer vermehrten Bindegewebsproduktion und einem verminderten Abbau. Der Anteil des extrazellulären Bindegewebes kann in der fibrotischen Leber um das Achtfache ansteigen [37, 90]. Dieser fibrotische Prozeß ist aufgrund der in 1.2.5 beschriebenen Vorgänge mit der Proliferation und Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) verbunden, indem die Transformation von ruhenden HSC zu Myofibroblast-ähnlichen Zellen initiiert wird. Die HSC zeigen somit eine qualitativ veränderte und eine gesteigerte Synthese von extrazellulärer Matrix (EZM) und exprimieren Zytokine und Zelloberflächenrezeptoren, die den fibrotischen Prozeß begünstigen.
Die myofibroblastischen Zellen werden als Hauptproduzenten von EZM gesehen, aber auch glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Gallengangsepithelien sind an der EZM-Synthese beteiligt.
Mehrere Zytokine wie TGF-β1, TNF-α, IFN-γ und PDGF sowie weniger potente Zytokine wie TGF-α, IGF-1, Acetaldehyd und Metabolite der Lipidperoxidation sind an dem veränderten Matrixstoffwechsel von HSC beteiligt.

Besonders TGF-β1 spielt eine große Rolle bei der Entstehung der Fibrose. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-β1 mit dem Grad der Fibrose und dem Kollagen Typ 1 positiv korreliert [3, 11, 18, 52, 63].
Neuere Erkentnisse zeigten, dass auch der Leptinsignalweg die Fibrogenese beeinflusst [47, 48].

1.3.1 Fibrogene Signale durch den Leptin-Rezeptor

Leptin ist ein 167 Aminosäuren-großes Protein. Die Funktion des Leptins ist es,die Masse von Fettgewebe und Körpergewicht zu regulieren. Leptin vermindert den Drang zur Nahrungsaufnahme und erhöht den Energieumsatz durch Hypothalamus-vermittelte Effekte [91].
Zusätzlich hat das Leptin Wirkungen auf die Angiogenese, die Hämatopoese und den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel. Auch Wirkungen auf Reproduktionsorgane, das Immunsystem und das Herz-Kreislaufsystem wurden beschrieben [10, 31, 34, 46, 67, 104].
Die Adipozyten sind die Hauptquelle der Leptinsynthese und -sekretion. Daneben kann Leptin in der Plazenta, in der Skelettmuskulatur und im Magen synthetisiert werden [1].
Die Sekretion von Leptin wird im Rahmen von Fettsucht durch Insulin, TNF-α, und Glucocorticoide induziert. Durch beta-adrenerge Einflüsse wie Fasten oder durch Thiazolidindione kann die Expression negativ reguliert werden [1]. Bei fehlendem Leptin, wie es im Mausmodell mit ob/ob-Mutation der Fall ist, kommt es zu Fettsucht, metabolischen Komplikationen und Insulinresistenz [12].

1.3.2 Der Leptinrezeptor

Der Leptinrezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase mit einer extrazellulären Hormonbindungsstelle, einer Transmembrandomäne, und einer phosphorylierbaren intrazellulären Domäne.
Der Leptinrezeptor ist bei Menschen in 1p31-Chromosom kodiert und hat mindestens sechs Isoformen (obRa bis obRf). Die Isoformen obRa, obRd und obRf sind membranständige Rezeptoren, während obRe nicht membranständig, sondern im Blut frei löslich vorkommt.

Es wird zwischen einen langen Isoform (obRb) mit langer intracellulärer Domäne (306 Aminosäuren) und kurzen Isoformen (obRa, obRc, obRd, und obRf) mit kurzen intrazellulären Domänen (32-40 Aminosäuren) unterschieden. Die lösliche Leptin-Rezeptor-Isoform (obRe) besitzt keine direkte Rolle bei der Signaltransduktion, sondern puffert den Leptinanteil im Blut [45]

Üblicherweise wird die lange obRb-Isoform als die „signalisierende“ Isoform angesehen (vgl. Abb.3). Kurze Rezeptorformen, die überall im Körper, besonders in der Lunge, der Niere und im Plexus choroideus exprimiert werden, sind auch in der Lage, divergente Signale zu senden [7, 50, 64].

Für die Signalübermittlung ist es notwendig, dass die Leptinrezeptoren dimerisieren. Dabei bildet sich ein tetramerer Komplex von Rezeptor und Ligand [23]. Die Bindung von Leptin führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Rezeptors und zur Anlagerung der Januskinase (JAK). Dadurch kommt es zur Aktivierung von Phosphorylierungsreaktionen, wodurch die STAT-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die aktivierte STAT1 und STAT3 wandern in dimerisierter Form in den Zellkern und regulieren die Transkription bestimmter Effektorproteine.

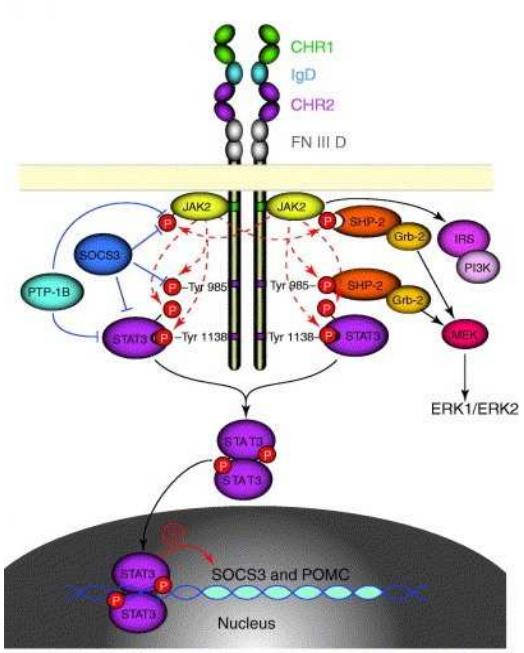


Abb. 3: Schematische Darstellung des Leptinsignalweges: der Leptinrezeptor ist ein transmembraner Multidocking-Rezeptor, der verschiedene intrazelluläre Signalwege einleitet (übernommen von Peelman et al. 2006 [71]).

1.3.3 Die Rolle des Leptin-Signalweges bei der Leberfibrose

Die Leberfibrose gehört zu den Krankheiten, die durch Leptin beeinflusst wird [47, 48]. Es konnte gezeigt werden, dass Leptin die Funktion eines profibrogenen Zytokines besitzt. Eine erhöhte Fibrose und Expression von Prokollagen Typ1 wurde beobachtet, wenn Ratten Leptin injiziert wurde, die mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt worden waren, um einen akuten bzw. chronischen Intoxikationsschaden der Leber zu erzeugen [47].

Sowohl eine Erhöhung von TGF-β als wichtigster fibrogener Mediator, als auch von α-Smooth-Muscle-Actin als myofibroblastischer Marker konnte festgestellt werden.

Sinusoidale Endothelzellen und Kupfferzellen wurden als Hauptzielzellen für die profibrogene Wirkung von Leptin in der Leber identifiziert [48].

Beide Zellen exprimieren funktionelle obRb-Rezeptoren und reagieren auf Leptin mit der Aktivierung des STAT-Signalweges und mit der Sekretion von TGF-β.

In der Leber wird Leptin von HSC produziert. Durch die parakrine Leptin-Stimulierung der TGF-ß-Synthese trägt der Leptin-Signalweg zur Fibrogenese bei. Allerdings konnte keine autokrine Wirkung von Leptin auf die HSC festgestellt werden, da sie nur die kurze Form von Leptinrezeptor obRa besitzen [47].

1.4 Genetische Polymorphismen im Leptin- und im Leptinrezeptor-Gen

Im Gen des Leptinrezeptors sind drei Polymorphismen bekannt. Neben dem Q223R-Polymorphismus, in dem an Position 223 ein Glutamin (Q) oder ein Arginin (R) vorkommen, wurde auch ein K656N-Polymorphismus entdeckt, der einen Austausch von Lysin gegen Asparagin am Codon 656 zeigt. Der Austausch von Lysin gegen Arginin wurde an Position 109 beobachtet (K109R). Außerdem findet man am Codon 343 eine „silent“-TC-Basentausch und am Codon 1019 ein „silent“-GA-Austausch.

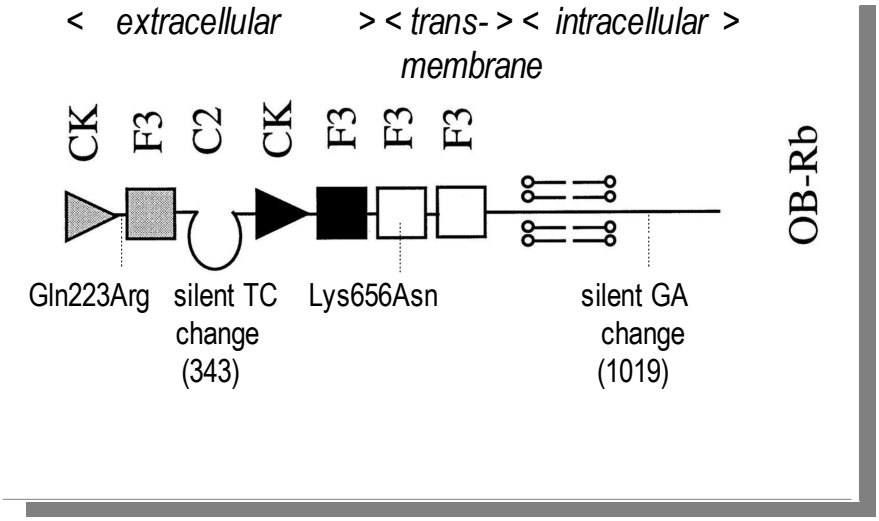
Am Leptingen findet man den Polymorphismus: LEP 19A>G (LEP-2548G>A).

1.4.1 Das Auftreten der Q223R-Mutation

Die Häufigkeit des Q223R-Polymorphismus wurde in 18 Artikeln beschrieben [16, 21, 22, 27, 28, 36, 53, 59, 61, 62, 78, 83, 93, 98, 102, 103, 105, 110] und von Parachcini et

al. in einer Studie zusammenfassend ausgewertet [70]. Die Häufigkeit des 223R-Allels variierte signifikant zwischen den Ländern und den ethnischen Gruppen. Besonders in Asien war die Häufigkeit des 223R-Allels signifikant höher als in anderen ethnischen Gruppen. In dem kaukasischen Probandenkollektiv trat das 223R-Allel mit einer Häufigkeit von 0,45 auf. Im asiatischen Kollektiv kam das 223R-Allel mit einer Häufigkeit von 0,85 vor [28, 53, 61].

Abb. 4: Schematischer Darstellung des Leptinreceptors (entnommem aus Thung Ming Fong et al.[32])



Mehrere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Q223R-Polymorphismus und dem Auftreten von Hypertonie, Diabetes mellitus, Lymphom- und Mammakarzinomerkrankungen [83, 84, 97, 107].

In einer Studie von Rosmond et al. wurden die Polymorphismen K109R, Q223R und K656N in Beziehung zu dem systolischen und diastolischen Blutdruck gesetzt [83]. Im Vergleich zu Lys109 (109KK) zeigte sich bei Patienten mit homozygotem Arg109 (109RR) sowohl ein niedrigerer Body-Mass-Index (BMI), als auch einen niedrigerer Blutdruck.

Auch bei Patienten mit dem Arg223-homozygotem Genotyp 223RR war der Blutdruck im Vergleich zu dem homozygoten Gln223 erniedrigt.

Der homozygote Lys109-Status (109KK) sowie der homozygote Gln223 (223QQ)-Status des Leptinrezeptors begünstigte ebenfalls die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 [84].

In der Studie von Snoussi et al. wurden die Leptin- und Leptinrezeptor-Polymorphismen auf ihre Assoziation zum Mammakarzinom bzw. zur Prognose des Mammakarzinoms geprüft [97]. Hierbei wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für das Mammakarzinom beim hetero- und homozygoten Auftreten des 223QR- bzw. 223RR-Genotyp des Leptinrezeptorgens gefunden.

Zude korreliert zum einen die Tumorgröße mit dem Auftreten des Q-Allels des Leptins und zum anderen die Überlebensrate mit dem 223R-Allels des Q223R-Locus des Leptinrezeptors.

Auch bei Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) wurde ein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen des Leptins und des Leptinrezeptors und dem Risiko einer follikulären Lymphom-Erkrankung diskutiert [107].

2 Aufgabenstellung

Das Gen des Leptinrezeptors liegt innerhalb des Chromosomenlokus 1p31. Ein Punktmutationspolymorphismus führt zu einem Aminosäureaustausch Glutamin [Q] zu Arginin [R] an Position 223, der möglicherweise mit einem erhöhten Risiko der Insulinresistenz und der Fettsucht assoziiert ist. Über die Auswirkung des Polymorphismus auf die profibrogenen Signalwege des Leptins bei chronischen, fibrotischen Lebererkrankungen liegen bislang keine Studien vor.

In der vorgelegten Arbeit sollte der genetische Polymorphismus Q223R im Gen des Leptinrezeptors als möglicher beeinflussender Faktor für die Progression der Leberschädigung bei chronischen Lebererkrankungen untersucht werden.

Für die Studien stand ein DNA-Probenkontingent zur Verfügung, das aus formalinfixierten, paraffin-eingebettenten Biopsien isoliert worden war und von Patienten mit chronischer Hepatitis C, mit nichtalkoholtoxischer und alkoholtoxischer Lebererkrankung stammte. Als Kontrollkollektiv sollten Proben von gesunden Blutspendern herangezogen werden.

Zunächst sollte die Real-Time-PCR zur Amplifikation und allelischen Diskriminierung der spezifischen Glutamin - bzw. Arginin-Sequenzen aufgebaut werden. Um ein Kontrollsystem bei der Etablierung der allelischen Diskriminierung zu besitzen, sollten die glutamin- und die argininkodierende Sequenzen jeweils kloniert werden.

Im nächsten Schritt sollte der Q223R Polymorphismus in den DNA-Proben der Patientenkollektive mit alkoholtoxischen und nicht-alkoholtoxischen Fettlebererkrankungen sowie mit chronischer Hepatitis C Infektion untersucht und die Verteilung der Gentoypen im Vergleich zum Probandenkollektiv dokumentiert werden. Das Auftreten der Q- und R- Allele sollte dann auf eine Assoziation mit dem Fibrosestadium, dem Entzündungsgrad und der Steatose geprüft werden.

3 Material und Methoden

Alle Grundchemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma (Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen) bezogen. Das verwendete Wasser aus der Milliporanlage wurde vor Gebrauch autoklaviert. Für alle Arbeitsschritte wurden Einwegplastikwaren (Reaktions- und Zentrifugationsgefäße) von der Firma Eppendorf (Hamburg) und der Firma Becton-Dickinson-Labware Europe (Le Pont de Claix, Frankreich) benutzt und vor dem Gebrauch ebenfalls autoklaviert.

3.1 Herstellung von Zielsequenzen als Kontrolle der SNP-Darstellung im Gen des Leptinrezeptors

3.1.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Mit einer Impföse wurden 50 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 2 µg Ampicillin/ml mit dem pBlueskript SKII+ positven DH5α–Gefrierstamm angeimpft. Die Kultur wurde bei 180rpm und 37˚C über Nacht inkubiert.

LB-Medium:	8g NaCl 5g Hefeextrakt 10g Bactotryptone ad 1l H_2O mit NaOH wurde der pH auf 7,6 eingestellt.
LB-Medium mit Ampicillin:	nach dem Autoklavieren des LB-Mediums und Abkühlen auf ca. 55°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 2µg/ml zugesetzt.

Am nächsten Tag erfolgte die Midi-Präparation mit Hilfe des PC-100-Plasmidkits der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.
Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 14000rpm und 4˚C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml eiskaltem Puffer S1 resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen wurde durch Einsatz von Puffer S2 eingeleitet. Nach

fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4 ml Puffer S3 zugegeben, vorsichtig gemischt und bei fünf Minuten Inkubation auf Eis die Proteine präzipitiert.
Anschließend wurden Proteine und genomische DNA bei 20000rpm in einer Zentrifuge pelletiert (Type J2- 21 der Firma Beckman® mit Rotor von Type JA 20) und der plasmidhaltige Überstand auf die zuvor mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule gegeben. Nach zwei Waschgängen mit 10 ml Puffer N3 erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer N5.
Zur DNA-Fällung wurde Isopropanol zugegeben und anschließend bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge 5417 der Firma Eppendorf für 30 Min. bei 4˚C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 120 µl H_2O gelöst.

Verwendete Puffer der Firma Macherey-Nagel:
S1: 50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
S2: 200 mM NaOH, 1% SDS
S3: 4,8 M Kaliumacetat, pH 5,1
N2: 100 mM TRIS, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH 6,3
N3: 100 mM TRIS, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3
N5: 100 mM TRIS, 15% Ethanol, 1 M KCl , pH 8,5

3.1.2 Restriktion des Plasmids pBlueskript SK+

Für die analytische Restriktion wurden folgenden Reagenzien eingesetzt:

Restriktionsansatz: 1 µg pBlueskript SK II DNA
1,0 µl Puffer 10 x
0,5 µl Enzym (Konz. 10U/µl)
ad 10µl H_2O

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet:
Bam H I, *Xho* I, *Pvu* I *und Pvu* II (*Die Enzyme wurden von der Firma Roche bezogen)*

Die DNA wurde jeweils mit den oben aufgeführten Enzymen bei 37˚C für drei Stunden verdaut und anschließend wurde die Restriktion durch Auftrennung der Fragmente in einer Submaringel-Elektrophorese (Kapitel 3.1.3) überprüft.

Präparative Restriktion mit Spe1 und EcoR1:
Zur Vorbereitung der Ligation (3.1.4) wurde pBlueskript SK II präparativ mit Spe I und Eco R I verdaut (vgl.Abb.9). Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionspuffer der Enzyme erfolgte die Restriktion in zwei seriellen Reaktionsansätzen.

Restriktionsansatz : 2,5 µl Puffer H für *Eco* R I, und NEBuffer 2 für *Spe* I
2,5 µl BSA
1,0 µl DNA (3µg/µl)
2,0 µl Restriktionsenzym (Spe 10 U/µl oder EcoRI 10 U/µl)
H_2O ad 25µl

Der Ansatz wurde 3 Std. bei 37˚C inkubiert. Zur Restriktionskontrolle wurde der Ansatz anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 3.3.) und mit unverdauter DNA verglichen.
Nach dem Verdau mit dem ersten Restriktionsenzym wurde eine DNA-Fällung durchgeführt: Dafür wurde der Restriktionsansatz mit 2-2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat 3M, pH 5,2 versetzt, kurz gemischt und zwei Stunden bei -20ºC gefällt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 Minuten bei 4°C in der 5417-Tischzentrifuge der Firma Eppendorf bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 70%-igem Alkohol gewaschen, kurz getrocknet und in 10µl H_2O gelöst und dann in den zweiten Restriktionsansatz mit EcoRI (s.o.) eingesetzt.

3.1.3 Dimerisierung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide 223AS, 223AAS, 223GS, und 223GAS wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert (Tabelle 3A). Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100µM in Wasser aufgenommen. Für die Dimerisierung wurden 223AS und 223AAS, bzw. 223GS und 223GAS im Verhältnis 1:1 zusammenpipetiert und anschließend mit dem gleichen Volumen 300mM NaCl, 20mM TRIS pH 8.0 versetzt (vgl. Tabelle 3 B).

Tabelle 3a: Verwendete Oligonukleotide für die Dimerisierung.

223AS	AAT TCT GGT GGA GTA ATT TTC CAG TCA CCT CTA ATG T	223A
223AAS	CTA GAC ATT AGA GGT GAC TGG AAA ATT ACT CCA CCA G	
223GS	AAT TCT GGT GGA GTA ATT TTC CGG TCA CCT CTA ATG T	223G
223GAS	CTA GAC ATT AGA GGT GAC CGG AAA ATT ACT CCA CCA G	

Tabelle 3b: Verwendung der Oligonukleotide zur Dimerisierung.

223AS 100µM	25 µl	=50 µl [50µM]	+ 50 µl (20 mM TRIS/ 300mM NaCl-Lsg)	223A [25 µM]
223AAS 100µM	25 µl			
223GS 100µM	25 µl	=50 µl [50µM]	+ 50 µl (20 mM TRIS / 300mM NaCl-Lsg)	223G [25 µM]
223GAS 100µM	25 µl			

Die Oligonukleotide wurden für 15 Minuten auf 95˚C erhitzt, und dann langsam abkühlen lassen.

3.1.4 Ligation und Transformation in *E.coli*

Zunächst wurde das Oligonukleotiddimer als Insert in die Multiple Cloning Site (MCS) des pBlueskript SK II-Vektors ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann in E.coli DH5α transformiert.

3.1.4.1 Ligation des Oligonukleotiddimer in den pBlueskript SKII-Vektor

Das Plasmid, das mit SpeI und EcoRI verdaut wurde, lag in einer Konzentration von 100ng/µl und die dimerisierten Oligonuclotide 223A und 223G lagen in einer Konzentration von 25µM vor (vergleiche Tab. 1B). Diese wurden mit H_2O auf eine Konzentration von 5 bzw. 2,5µM verdünnt. Für die Ligation wurden die dimerisierten Oligonukleotide in Verhältnis von 5:1 bzw. 2:1 zum Vektor eingesetzt und in den folgenden Ansatz zusammenpipettiert:

Ansatz:	geschnittener Vektor pBlueskript SKII	2,5µl
	5pmol/2,5pmol Insert (223A, 223G)	1,0µl
	Puffer T4-DNA-Ligase 10x	1,0µl
	DNA-T4-Ligase	1,0µl
		ad 10 µl H_2O

In einem Kontrollansatz wurde kein Insert zugesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 15˚C inkubiert.

3.1.4.2 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen und Transformation des Ligationsansatzes

Von einer Übernachtkultur mit *E.coli* wurden 100µl in 50 ml frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer Dichte von OD 600 = 0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend wurde das Pellet in 5 ml LB-Medium aufgenommen. Um kompetente Zellen für die Transformation zu gewinnen wurden 5ml TSS (2x) dazu gegeben, kurz gemischt und die *E.coli* sofort schockgefroren. Die Zellen wurden bei -70˚C gelagert.

TSS-Lösung 2x:	20% (w/v) PEG 8000
	10% (v/v) DMSO
	70 mM $MgCl_2$ in LB-Medium, pH 6,5

3.1.4.3 Transformation in *E.coli*

Aliquots kompetenter *E.coli*-Zellen à 200 µl wurden auf Eis aufgetaut. Die Ligationsansätze wurden vorsichtig dazugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden in ein Wasserbad (42˚C) für eine Minute inkubiert. Anschließend wurde 600 µl SOC-Medium dazu pipettiert und eine Stunde bei 160 rpm und 37˚C geschüttelt.

SOC-Medium:	10mM $MgCl_2$ in LB-Medium

3.1.4.4 Identifizierung von Rekombinanten durch die Blau-Weiß-Selektion

Die Transformationsansätze wurden auf ampicillinhaltigen Agarböden, die vorher mit IPTG + X-Gal versetzt worden waren, ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37˚C kultiviert.
Der Einsatz von IPTG und X-Gal führte zu einer sogenannten Blau-Weiß-Selektion der Kolonien, die sicherstellen sollte, dass Bakterien, deren Plasmid das Insert enthielt, von denen ohne Insert unterschieden werden konnte. Die Blau-Weiß-Selektion basiert auf dem ß-Galaktosidase-kodierenden lac-Z-Gen in der Multiple-Cloning-Site des pBlueskript SK-Plasmids. Bei Kolonien ohne Insert wird nach Operator-Induktion durch IPTG ß-Galaktosidase synthetisiert, und die Galactosidase-Aktivität führt zur Umsetzung von X-Gal zu einem bläulichen Niederschlag. Die Kolonien sehen damit blau aus. In Bakterienkolonien, in denen das LacZ-Gen des pBlueskript SK durch die Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen wurde, ist das Enzym ß-Galaktosidase fehlerhaft. Die Bakterienkolonien bleiben weiß.

LB-Agar-Platten: 15g Bacto-Agar ad 1l LB-Medium wurde für 20 min bei 124ºC autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Agarlösung auf 60ºC abkühlen gelassen und dann Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Unter der Laminaflow wurde die Lösung in Petrischalen (Firma Sarsted) gegossen (ca. 15 ml/ Platte). Die Platten wurden bei 4ºC gelagert.

Vorbereitung von IPTG- und X-Gal -Platten: Auf die Agarplatten wurden 20µl IPTG-Lösung und 50µl X-Gal-Lösung pro Platte verteilt.

IPTG-Lösung (100mM): 500mg Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) in 20ml destillierten H_2O lösen und sterilfiltrieren. Lagerung auf -20ºC.

X-Gal-Löung: 25mg 5-Brom-4chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal) in 1,25ml Dimethylformamid lösen.

3.1.5 Sichtung der DH5α-Transformationskolonien für Rekombinanten

Die Sichtung der Transformanten wurde auf Basis der Blau-Weiß-Selektion mit Hilfe Restriktionscharakterisierung der PCR-Amplifikate potentiell positiver Rekombinanten vorgenommen. Dazu wurde von weiß-selektionierten Kolonien eine Flüssigkeitskultur angezogen, die Plasmide isoliert und der Rekombinationslocus PCR-amplifiziert. Die Amplikons wurde dann anhand der Größe und der Restriktionsstellen charakterisiert.

3.1.5.1 Minikultur und Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Für die Minikultur wurden einzelne liegende weiße Kolonien aus dem Nährmedium entnommen und in ein Glasröhrchen mit 3ml LB-Nährlösung mit Ampicillin (vgl. 3.1.1) überführt. Die Röhrchen wurden über Nacht auf einem Rundschüttler bei 160rpm und 37˚C inkubiert.
Nach der Inkubation wurde eine Minipräparation der Plasmid-DNA durchgeführt:
Von der Übernachtkultur wurden 1,5ml in ein Eppendorfgefäß gegeben und zentrifugiert bei 13.000rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150µl S1-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 150µl S2-Puffer zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Kurz danach wurden 150µl S3-Puffer dazugegeben und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden bei 13000rpm für fünf Minuten unter Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt.
Anschließend erfolgte die Alkoholpräzipation: der DNA-haltige Überstand wurde mit doppeltem Volumen Isopropanol versetzt und für 20 Minuten bei -20ºC stehen gelassen, um danach für 30 Minuten bei 13.000rpm und 4ºC zentrifugiert zu werden. Das Isopropanol wurde dekantiert und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und danach in 30µl Wasser aufgenommen.

3.1.5.2 Amplifikation des pBlueskript SK II Polylinkers durch PCR und anschließende Restriktion

Um sicherzustellen, dass das gewünschte Insert im Plasmid enthalten ist, wurde die DNA aus der Minipräparation in ein PCR eingesetzt. Die Taq-Polymerase und der Puf-

fer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die dNTP´s und die Primer wurden von der Firma Fermentas hergestellt.
Pro Probe wurden folgende Reagenzien benötigt:

2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP
0,5 µl Primer M13F
0,5 µl Primer M13R
0,5 µl Taq- Polymerase
17,5 µl Wasser
1 µl 1:10 verdünnte DNA

Tabelle 4: Sequenz der verwendeten forward- und reverse-Primern

Primer	Sequenz
M13 Forward	5´-GTAAAACGACGGCCAG-3´
M13 Reverse	5´-CAGGAAACAGCTARGAC-3´

Die Reagenzien wurden zusammenpipettiert und gemischt. Folgende Thermoprofil wurde in den Thermocycler PTC-200 von der Firma MJ Research eingegeben:
Für die ersten zwei Minuten wurde der Ansatz auf 95ºC erhitzt, danach erfolgten 45 Amplifikationszyklen mit jeweils einer Minute Inkubationen bei 94ºC, 55ºC und 72ºC. Abschließend folgte eine 7-minütige Inkubation bei 72ºC.
Nach erfolgter PCR wurde das Amplifikat mit Restriktionsenzym Hind III verdaut. Für die Restriktion wurde ein Mastermix zusammenpipettiert. Pro Probe wurde benötigt:

1,5 µl Puffer B (Roche)
2,75 µl Wasser
0,75 µl Hind III (Roche)

5µl des Mastermix wurden auf 10 µl des PCR-Produkts gegeben und anschließend für fünf Stunden bei 37ºC inkubiert. Der Verdau wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.5.3 Sequenzierung der Rekombinanten-DNA

Das Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Claudia Stock sequenziert. Die Sequenz wurde mit dem Programm DNAsis (Hitachi, Japan) überprüft.

3.2. Auftrennung von DNA durch Submaringelelektrohorese

PCR-amplifizierte oder durch Restriktion hergestellte DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 3%-igen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Gele wurden hergestellt, indem 3g Agarose in 100ml 1x TAE-Puffer (40mM Tris, 20mM Na-Acetat pH 8,2, 1,25mM EDTA) für ca. zwei bis vier Minuten in einer Mikrowelle gekocht, 10µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zugefügt und nach Abkühlen auf ca. 65°C in eine Flachform mit Kammeinsätzen zur Ausbildung von Kammern gegossen wurden. Auf das fertige Gel wurden die Amplifikate in den Kammeraussparungen aufgetragen. Hierfür wurden 10µl des PCR-Produktes mit ca. 1µl DNA-Probenpuffer (6x Loading Dye Solution, MBI) versetzt und in die Kammern gegeben. Als Molekulargewichtsstandard diente der Leitmarker pUC 19 DNA/MSPI (Hpa2) Marker 23 der Firma MBI Fermentas, der ebenfalls mit dem DNA-Probenpuffer versetzt und in eine Kammer des Gels eingefüllt wurde. Der Marker enthält DNA-Fragmente mit den Größen 500 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp und 111 bp.

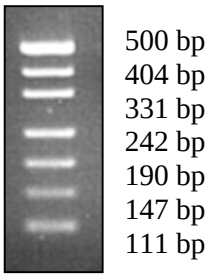


Abb. 5: Darstellung des Laufverhaltens des Größenstandards „Marker 23“ in einem 3 %-igen Agarosegel. Die apparenten Basenlängen der Fragmente sind seitlich angegeben.

Nachdem das Plasmid sowohl mit Hilfe von Restriktionsanalyse als auch Sequenzanalyse überprüft wurde, konnte eine Midikultur und eine Midipräparation wie unter Punkt 3.1.1 vorgenommen werden, um größere Mengen DNA gewinnen zu können. Die E.coli-Bakterien wurden dafür aus der Minikultur angeimpft.

3.3. Patientenmaterial

Die für die Untersuchungen eingesetzte DNA stammte von formalinfixierten, paraffineingebetteten Leberbiopsien, die am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum zu Köln archiviert wurden und aus lokalen, sowie bundesweiten Einsendungen stammten. Im Rahmen des Routineablaufes wurden die eingesandten Biopsien zunächst für ungefähr sechs bis acht Stunden in 4%-iger Formaldehydlösung fixiert und anschießend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Es folgte die Einbettung mit heißem Paraffin in die dafür vorgesehenen Kassetten. Nach Aushärtung des Materials wurden die Gewebeschnitte zur weiteren Verwendung angefertigt.

3.3.1. Probenkollektiv mit NAFLD/AFLD

Aus dem Eingangsregister des Institutes für Pathologie wurde eine Vorauswahl an Leberbiopsien getroffen, die bei der Routinediagnostik als Alkoholische (AFLD) oder Nicht-Alkoholische (NAFLD) Fettlebererkrankungen während der Routinediagnostik befundet wurden. Demnach kamen 227 Vorgänge für eine genauere Recherche in Frage. Unter den bekannten Eingangsnummern wurden die Einsendescheine gesichtet und auf klinische Angaben des Einsenders geprüft. Dabei wurde die vollständige Angabe von Grund- oder Verdachtserkrankung, Angaben auf Alkoholabusus, sowie Laborparameter wie GOT, GPT und γ-GT als essentielle Parameter herangezogen. Als weitere Angaben wurden Zusatzinformationen über die Patientenanamnese, wie Diabetes mellitus oder Adipositas, an Information aufgenommen. Die Dokumentation von Eingangsnummer, Alter, Anamnese und Labor erfolgte in einer Exceltabelle.

Nach den Hauptkriterien wurden die Patienten mit der Verdachtsdiagnose NASH ohne bekannten Alkohlabusus in die Gruppe der NAFLD (140 Proben) gruppiert , während Patienten mit Alkoholkonsum in die Gruppe der AFLD (87 Proben) kategorisiert wurden.
Die Probenauswahl wurde von Johannes Rey durchgeführt und die Proben wurden mir freundlicherweise als DNA-Proben zur Analyse des Leptinrezeptor-SNP-Q223R überlassen.

3.3.2 Probenkollektiv mit Hepatitis C

Das HCV-Probenkollektiv beinhaltete 302 HCV-Proben, von denen 212 Proben nach histologischer Befundung durch Frau Dr. Uta Drebber in Fibrosegrade klassifiziert wurden.
Die DNA war in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weiskirchen (Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Aachen) isoliert worden und wurde mir zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt.

3.3.3 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe diente ein Blutspender-Probenkollektiv, das von Frau Dr. Nuran Bektaz (jetzt Institut für Pathologie, Aachen) und Professor Dr. A. zur Hausen (jetzt Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg) zusammengestellt wurde. Von 265 Blutproben wurde mir die DNA überlassen.

3.4 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative real-time-PCR angewandt. Bei der Real-Time-Polymerasekettenreaktion wird parallel zur Amplifikation die Menge des Amplifikats mit Hilfe einer fluoresierende Sonde (TaqMan®) detektiert. Die Sonde ist an ihren Enden mit Quentcher und Reporter besetzt. Mit Hilfe von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge von 488nm wird die Sonde zur Fluoreszenz angeregt. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5´-Ende der Sonde gebunden. In dieser Arbeit wurden die Reporterfarbstoffe VIC und FAM mit Emission bei 535-555nm bzw. 492-516nm benutzt.
Durch die räumliche Nähe von Reporter zu Quentcher wird die Fluoreszenz durch Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) unterdrückt. Stößt die Taq-Polymerase während der Elongation (5´→3´) auf die Sonde, beginnt sie aufgrund ihrer Exonukleaseaktivität die Sonde abzubauen. Durch den Verlust des Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) beginnt der Reporter zu fluoreszieren. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt, und die Signalstärke steigt entsprechend.

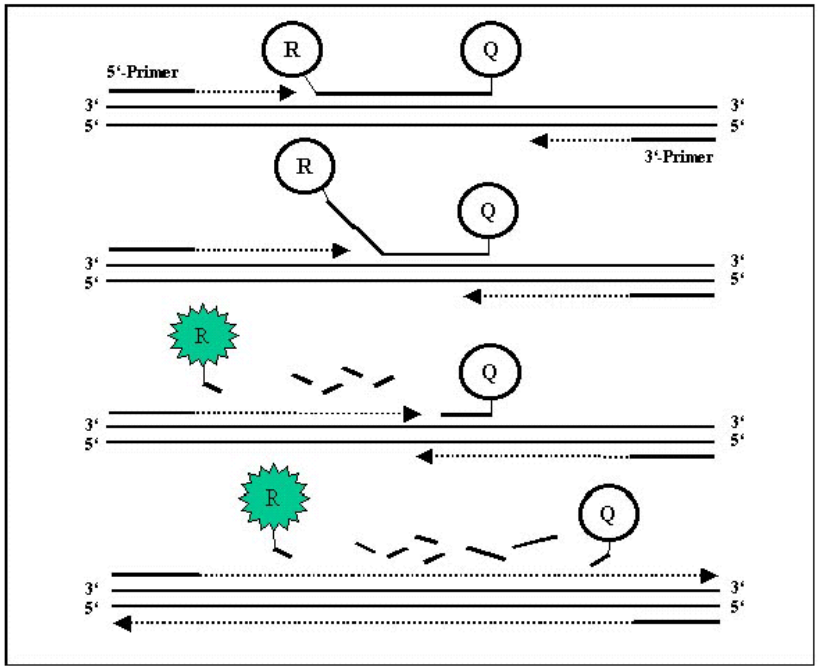


Abb. 6: Darstellung der 5´-3´-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase. Bei der Extension wird der Reporter-Farbstoff (R) vom Quenscher Farbstoff (Q) abgespalten und erzeugt ein Fluoreszenzsignal. (übernommen von www.edoc.hu-berlin.de).

3.4.1 Nachweis von der Q223R-Mutation durch Real-Time-PCR

Bei der Austestung wurden die in pBlueskript einklonierten Kontrollsequenzen verwendet. Hierzu wurden die folgenden Primer für pBlueskript von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) im Auftrag synthetisiert. Die Primer wurden in verschiedenen Kombinationen in eine Kontroll-PCR eingesetzt und getestet.

Tabelle 5:Sequenz der pBluesk forward- und reverse-Primern

Name	Sequenz	Schmelzpunkt
pBluesk-F	5´-TACgACTCACTATAgggCgAATTg	61,0 ºC
pBluesk-F3	5´-CGGTATCgATAAgCTTgATATCgA	59,3 ºC
pBluesk-R1	5´-CACTAAAgggAACAAAAgCTggAg	61,0 ºC

Für die Austestung der Kontrollsequenzen mittels Real-Time-PCR (SyBr-Green) wurden pro Probe folgende Reagenzien benötigt:

12,5µl Mastermix (Firma Eppendorf, Hamburg)
1µl forward-Primer
1µl reverse-Primer
9,5µl H_20
1µl DNA

Für den Real-Time-PCR-Nachweis der Q223R-Mutation am humanen Material wurde eine Reagenzienzusammenstellung der Firma Applied Biosystems (Artikel-No: C_8722581_10) benutzt.
Die folgenden Sequenzen sollten dabei durch Fam- bzw. Vic-markierten Sonden unterschieden werden:

ATCACATCTGGTGGAGTAATTTTCC[A]GTCACCTCTAATGTCAGTTCAGCCC Glutamin (Q)

ATCACATCTGGTGGAGTAATTTTCC[G]GTCACCTCTAATGTCAGTTCAGCCC Arginin (R)

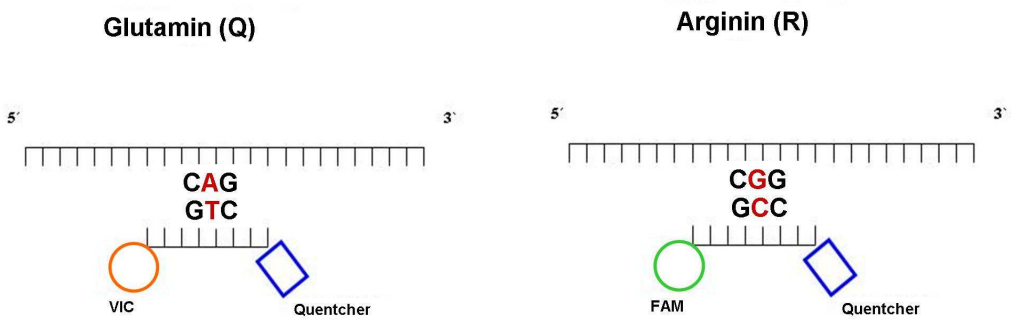


Abb: 7 Schematische Darstellung der Sondendifferenzierung des Sequenzbereichs Glutamin (Q)-Formation bzw. Arginin (R)-Formation.

Tabelle 6: Reaktionsansatz zur Differenzierung des Q223R-Lokus mittels RT-PCR

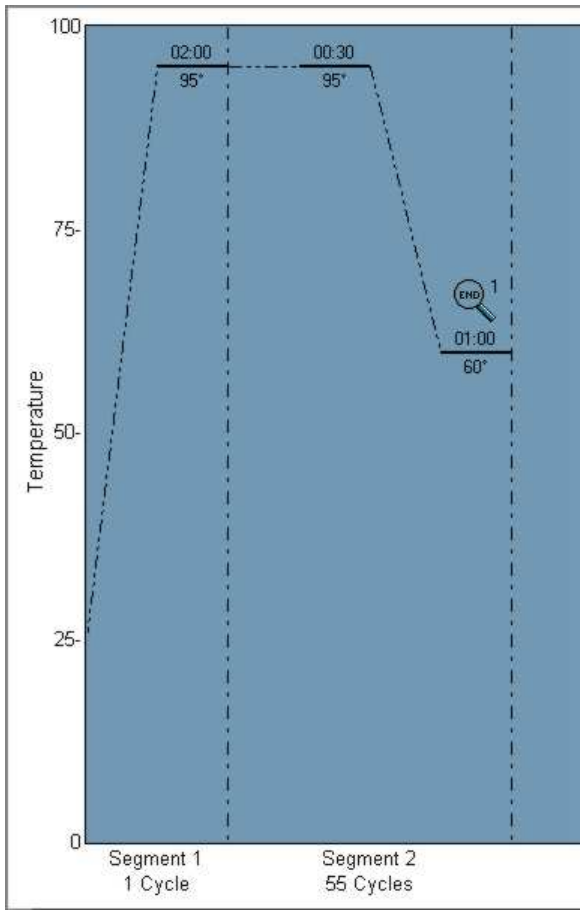
ezeichnung	Einsatzvolumen
ppendorf Master Mix	5µl
rimer/Sonde Mix bestehend aus reverse/antisense Primer 10µM), und TaqMan®–Sonde wt/mut (0,5µM bis 10µM)	0,25µl
I_2O	3,75µl
)NA	1µl
esamt	10µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Stratagene (Mx 3000P) mit in der Abbildung 8 dargestelltem Temperaturprofil durchgeführt.

Abb. 8:
Für die QRT-PCR wurde das folgende Temperaturprofil gewählt:

Segment 1: während der ersten zwei Minuten wurde der Ansatz von 25°C auf 95ºC erhitzt.

Segment 2: anschließend erfolgten 55 Zyklen, in denen der Ansatz für 30 Sekunden auf 95ºC erhitzt und nachfolgend die Temperatur für eine Minute bei 60 ºC gehalten wurde.



3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Experimente wurden statistisch mit dem Programm SPSS 14,0 ausgewertet. Die Häufigkeiten von Genotypen wurden in Kreuztabellen aufgeführt und in Bezug zur Entzündung, Fibrose und Fettgehalt gesetzt. Hierbei wurde die Signifikanz mittels Exakter Test nach Fischer berechnet. Um die odds ratio für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Allels auszurechnen, wurde eine binär-logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Kontrollsequenzen

Zur Herstellung von Kontrollsequenzen wurden Oligodimere, die jeweils die N-terminale Sequenz des Q223R-Gens ohne und mit Basenaustausch repräsentierten und in den Blueskript-SKII+ einkloniert. Dafür wurden Oligonukleotidimere endständig mit EcoRI- und SpeI-spezifischen Überhängen hergestellt und in den EcoRI- und SpeI-geöffneteten Vektor inseriert (vgl. Abb. 9). Durch PCR-Amplifikation und anschließende Restriktion wurde kontrolliert, ob die Q223R-Insert in dem Vektor vorhanden war. Abbildung 10 zeigt die Polylinker-Amplifikate nach Verdau mit den Enzymen Hind III und BamHI.

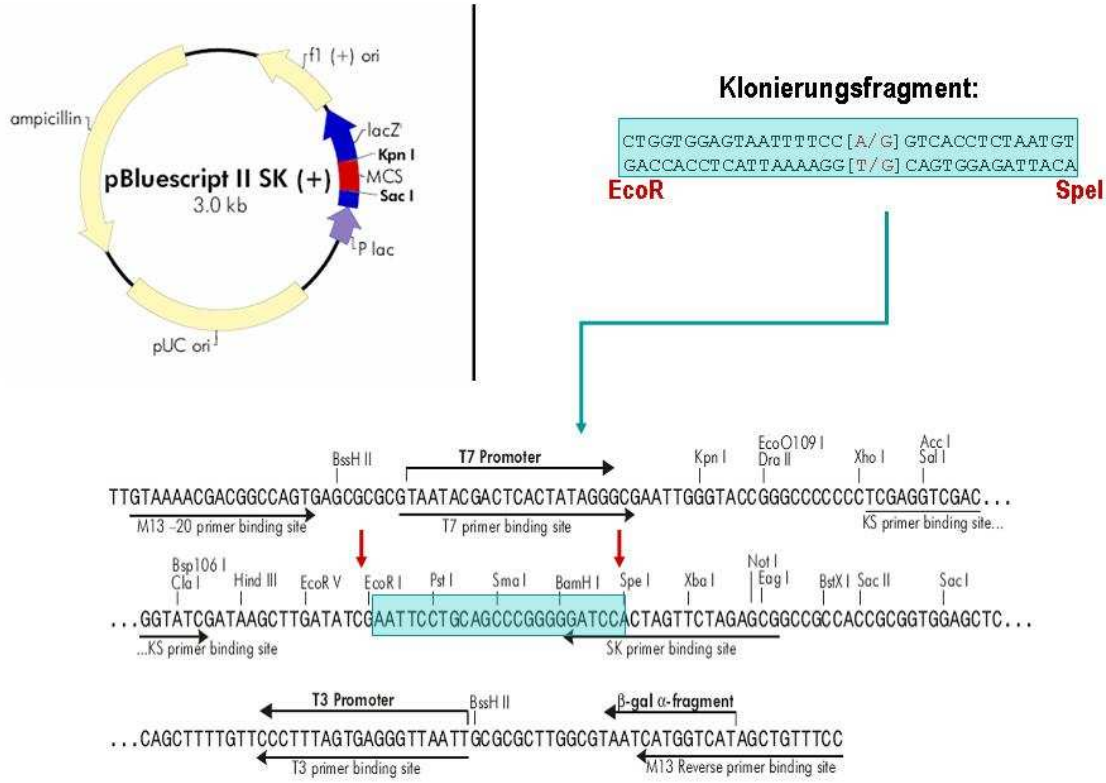
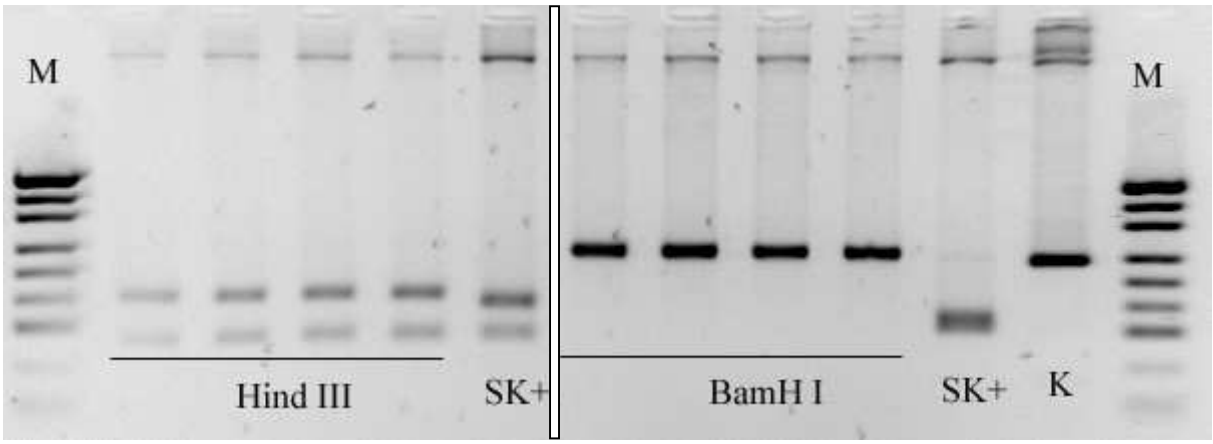


Abb. 9: Klonierungsstrategie zur Herstellung von Kontrollsequenzen

Der Vektor Blueskript SK+ ist mit der „Multiple Cloning Site“ (MCS) dargestellt. Das Klonierungsfragement mit endständigen Restriktionsstellen (EcoRI, SpeI), das die jeweilige Kontrollsequenzen beinhaltete, ist türkis gekennzeichnet. Die Kontrollsequenzen wurden in die mit roten Pfeilen markierten Restriktionschnittstellen (EcoRI und SpeI) der MCS des Blueskript-Vektors SK+ einkloniert.

Die gelektrophoretische Auftrennung der Polylinker-Amplifikate nach BamHI-Verdau zeigte ein Fragment mit apparenter Basenlänge von 240bp, entsprechend der Lauflänge des ungeschnittenen Polylinker-Amplifikats. Nach Hind III-Restriktion wurde das Amplifikat der Proben 1-4 in zwei Fragmente geschnitten. Hier wurde eine Basenlänge von 90 und 150bp (Basenpaare) erzielt.



A. **B.**

Abb. 10: Gelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate des Blueskript II SK+ Polylinkers nach Hind III (A) und BamHI (B) Restriktion; M zeigt den Standard Marker 23, K ungeschnittenes Polylinker-M13-Amplifikat, SK+ geschnittener Polylinker M-13-Amplifikat

Das Insert wurde durch Sequenzierung und Abgleich mittels EDV-gestützter Software „DNAsis“ als erfolgreich kloniert gestestet.

4.1.1 Etablierung der SNP-Analyse mit Hilfe der klonierten Kontrollsequenzen und DNA aus Blutproben

Für die Etablierung der SNP-Analyse der klonierten Kontrollsequenzen wurde das Plasmid in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt mit den Primern wie in Tabelle 5 angegeben.

Der Kontrollsequenz wurde in einer Verdünnungsreihe ausgehend von einer Lösung mit der Konzentration 2ng/µl, entsprechend ca. 100.000.000 Molekülen pro µl eingesetzt. 1µl des Ausgangskonzentrats wurde in sechs Schritten mit Heringspermien-DNA

(Konz. 100µg/ml) verdünnt, so dass die Endkonzentration der Verdünnungsreihe 10 Moleküle pro µl betrug. Die Real-Time-PCR erfolgte mit dem Farbstoff SyBr-Green.

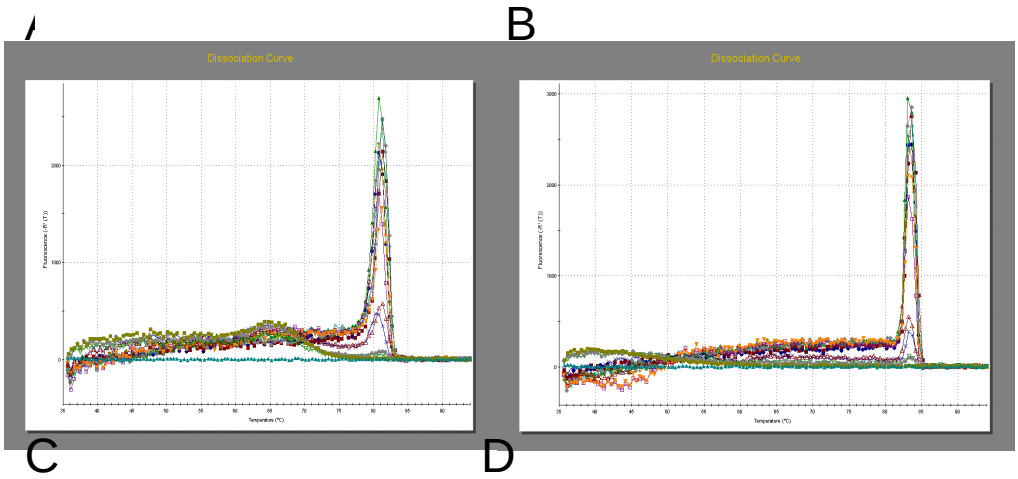
Da die Schmelztemperatur eines PCR-Fragments von seiner Größe und seines GC/AT-Gehalts abhängig ist, kann durch die Schmelzkurve geprüft werden, ob nur ein spezifisches PCR-Produkt generiert wurde oder ob mehrere DNA-Fragmente im Ansatz vorliegen.

Die spezifische Schmelztemperatur liegt im Wendepunkt des Bereichs der stärksten Änderung des Signals. Bei der Amplifikation der Kontrollsequenz muss die Schmelzkurve für jeden Amplifikationsansatz identisch sein, und somit ist nur ein Gipfel erkennbar. In den Abbildungen 11a und b wurde dies für Plasmid 349 und Plasmid 350 dargestellt.

Mit Hilfe einer Standardkurve kann die Effizienz der differenzierten Sequenzdetektion geprüft werden.

Bei den Standardkurven in Abbildung 11c und d wurden zwei verschiedene forward-Primer eingesetzt: p-Blueskp-F und P-Blueskp-F3. Als reverse-Primer wurde p-Blueskp-R1 eingesetzt.

Es zeigte sich weder in der Dissoziationskurve, noch in der Standardkurve ein klarer Unterschied zwischen den eingesetzten Primern. Mit beiden konnte erfolgreich ein ähnlicher Kurvenverlauf erzielt werden. Die Effizienz lag für Primer p-Blueskp-F bei 66,8% und für Primer p-Blueskp-F3 bei 71,1%.



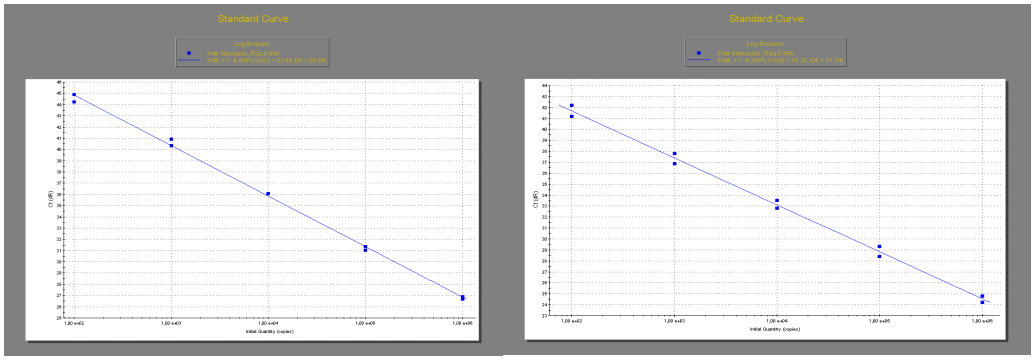


Abb. 11: Darstellung der Schmelzkurve (Abb. A und B) und Standardkurve (Abb. C und D) der klonierten Kontrollsequenz Nr. 349 bzw. 350

Da die Effizienz bei Primer p-Blueskp-F3 etwas höher war, wurde p-Blueskp-F3 gewählt.

Um sehen zu können, ob die Sonden zur Differenzierung der Glutamin- bzw.- der Arginin-codierenden Sequenzen die entsprechenden Kontrolldomänen erkennen können, wurden auch hier Testläufe mittels Real-Time-PCR durchgeführt.

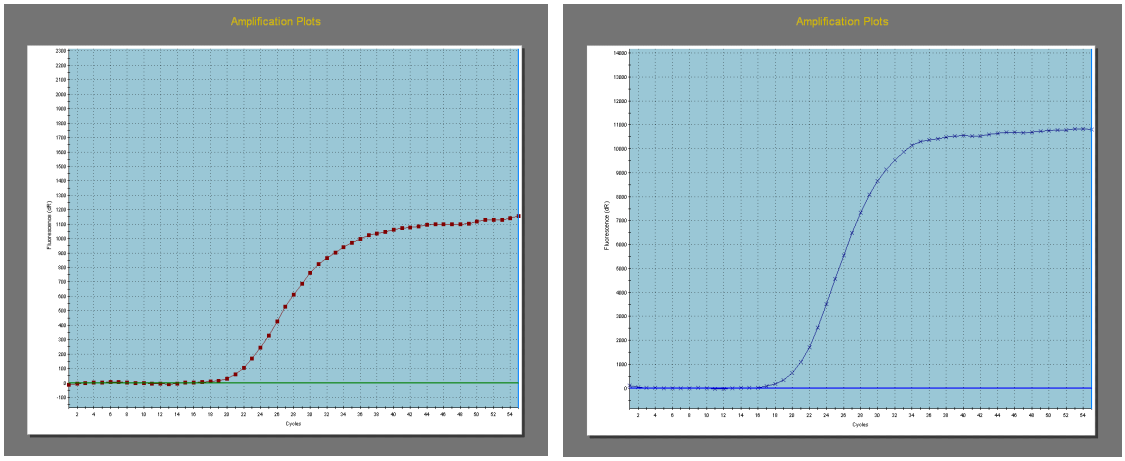
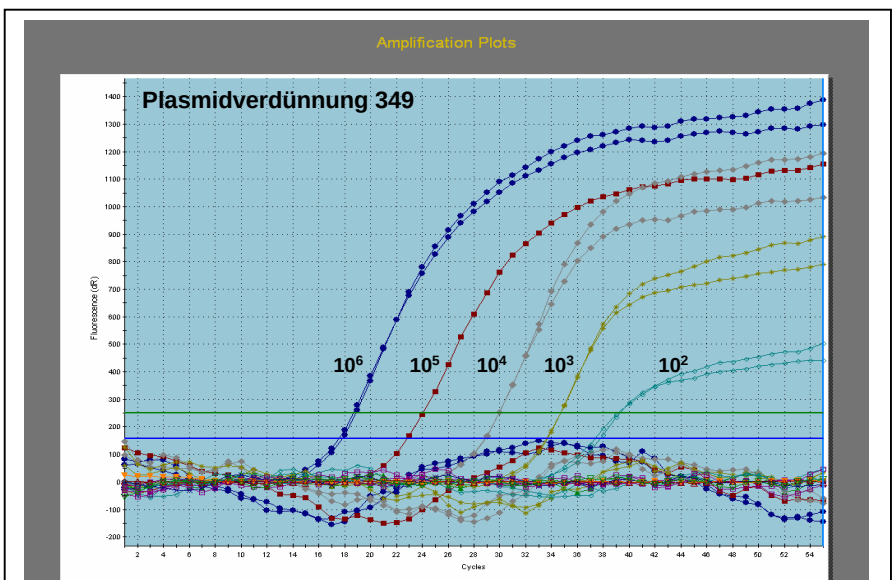


Abb. 12: Kurvenverlauf der SNP Analyse von Plasmid 349 (Rote Kurve) bzw. Plasmid 350 (Blaue Kurve).



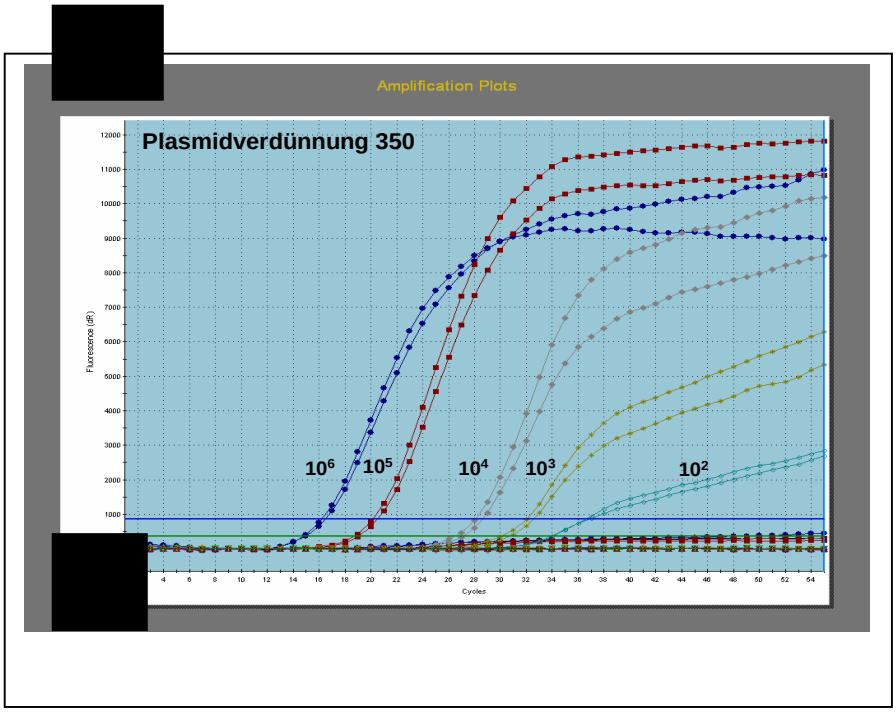


Abb. 13: A: Differentielle Detektion des Q-(Gln)-spezifischen Plasmides 349 durch die Vic-markierte Sonde (A) und des R-(Arg)-spezifischen Plasmides (350) durch die Fam-markierte Sonde (B). Der Q223R Locus der Plasmide 349 und 350 wird in den Verdünnungen zwischen 10^6 und 10^2 erfolgreich detektiert und unterschieden. **B:** Differentielle Detektion des R-(Arg)-spezifischen Plasmides (350) durch die Fam-markierte Sonde (B). Der Q223R Locus der Plasmide 349 und 350 wird in den Verdünnungen zwischen 10^6 und 10^2 erfolgreich detektiert und unterschieden.

4.1.2 Testreihen mit DNA aus Blutproben

Bei der Austestung der SNP-Analyse wurde DNA aus Blutproben eingesetzt. Es wurden zwei Ansätze mit Gesamtvolumen 10µl (Ansatz 1) bzw. 15µl (Ansatz 2) ausgetestet. Die eingesetzte DNA-Menge betrug jeweils 1µl. Im Ansatz 2 zeigte sich im Lauf der Real-Time-PCR ein hohes Fluoreszenzsignal. Ein Ansatzvolumen von 10µl wurde für die weiteren Analysen der Blutproben gewählt, da die Fluoreszenz ausreichend stark war (vgl. Abb.14A) und so Reagenzien eingespart werden konnten.

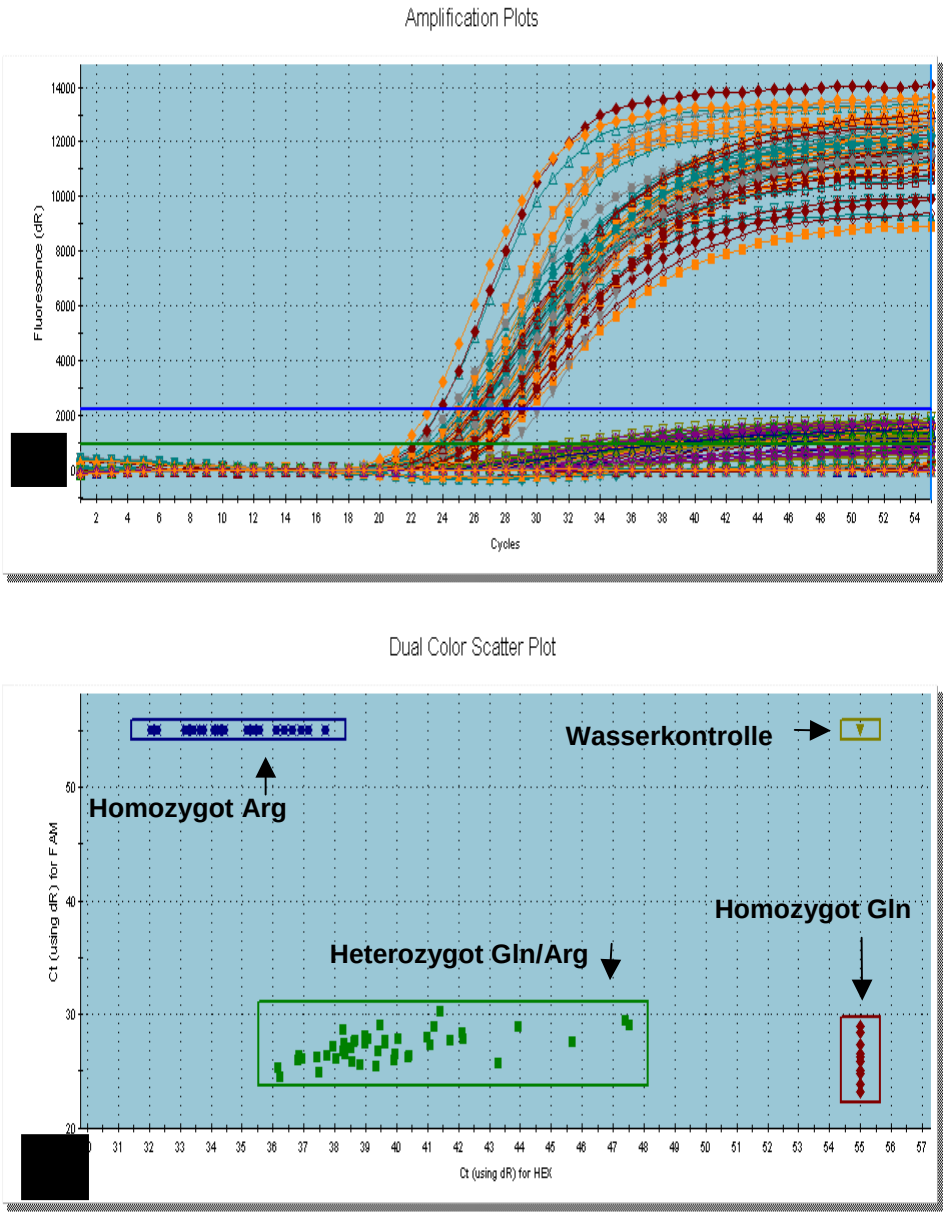


Abb. 14: SNP Testreihen mit Blutproben: Kurvenverläufe der SNP-Testreihen (A) und genotypische Verteilung (B) dargestellt im Blot zur allelischen Diskriminierung (Programm: Stratagene Mx 3000P).

4.2 Darstellung und Auftreten des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors in dem Probandenkollektiv

In dem Probandenkollektiv handelte es sich um 265 Blutproben. Eine SNP-Analyse der Q223R-Mutation des Probandenkollektivs wurde nach dem in 4.1 beschriebenen etablierten Ansatz durchgeführt. In allen Proben - bis auf zwei - konnte die DNA erfolgreich amplifiziert und eine Auswertung durchgeführt werden.

Die Analyse ergab 55,5% heterozygote QR (n=146), 16,7% homozygote R (n=44) und 27,8% homozygote Q (n=73).

Die Verteilung der Genotypen wurde in Abbildung 15 und Tabelle 7 zusammengefasst.

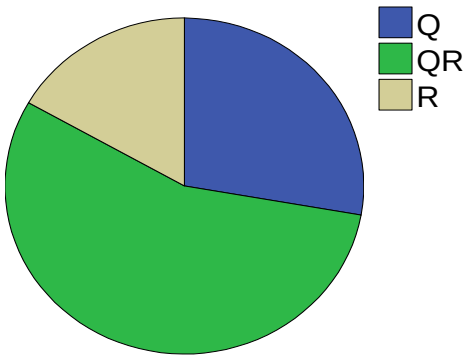


Abb. 15: Verteilung der Leptinrezeptorgenotypen an Codon 223 im Probandenlkollektiv. Q= Homozygot QQ, QR= Heterozygot, R= Homozygot RR.

Tabelle 7: Häufigkeit der Genotypen des Leptinrezeptor-Gens im Probandenkollektiv.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Geno-typ	QQ	73	27,8	27,8	27,8
	QR	146	55,5	55,5	83,3
	RR	44	16,7	16,7	100,0
	Gesamt	263	100,0	100,0	

4.3 Der Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors bei Patienten mit Nicht-Alkoholischen und Alkoholischen Fettlebererkrankungen

Nachdem die Verteilung des Q223R-Polymorphismus in den Blutproben des Pobanden-kollektivs untersucht worden war, wurden anschließend die SNP-Analysen im NAFLD- und im AFLD-Kollektiv analysiert.

4.3.1 Auftreten des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors bei Patienten mit einer Nicht-Alkoholischen Fettlebererkrankung

Zunächst wurde getestet, ob die PCR-Amplikation und Polymorphismusdifferenzierung am archivierten paraffineingebetteten Probenmaterial (FFPE) durchgeführt werden konnte. Die Testreihen ergaben (Daten nicht gezeigt), dass die DNA-Extrakte aus FFPE-Materialien geeignet waren, den Q223R-Leptin-Polymorphismus nachzuweisen. An 140 DNA-Extrakten des NAFLD-Patientenkollektivs wurde der Q223R-Polymorphismus analysiert. Es waren 23,4 Prozent homozygot Q (n=32), 51,8 Prozent heterozygot (n=71) und 24,8 Prozent homozygot R (n=34). In diesem Kollektiv konnte die DNA in drei von 140 Proben nicht amplificiert werden.
Die Verteilung der Genotypen ist in Abbildung 16 und Tabelle 8 zusammengefasst.

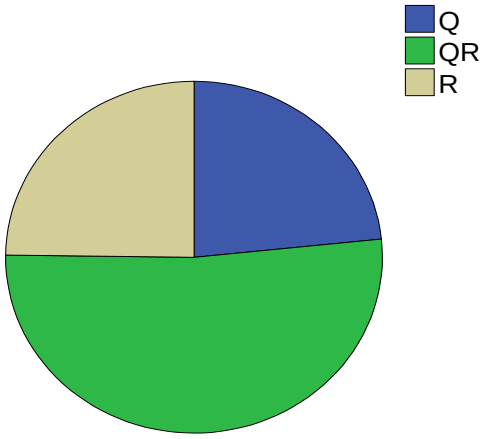


Abb. 16: Verteilung der Leptinrezeptorgenotypen an Codon 223 im Patientenkollektiv mit NAFLD: Q= homozygot QQ, QR= heterozygot, R= homozygot RR.

Tabelle 8: Verteilung der Genotypen des Leptinrezeptors im Patientenkollektiv mit NAFLD

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Genotyp	QQ	32	23,4	23,4	23,4
	QR	71	51,8	51,8	75,2
	RR	34	24,8	24,8	100,0

Gesamt	137	100,0	100,0	

4.3.2 Auftreten des Q223R-Polymorphismus im Patientenkollektiv mit einer Alkoholischen Fettlebererkrankung)

Im AFLD-Patientenkollektiv handelte es sich ebenfalls um paraffineingebettetes Material. Bei der SNP-Analyse der 87 Proben kam es zu folgender Verteilung: 40,5 Prozent der Patienten waren heterozygot (n=32), 25,3 Prozent homozygot R (n= 20) und 34,2 Prozent homozygot Q (n=27). In acht Proben konnte keine eindeutige Auswertung stattfinden.

Die Verteilung der Genotypen wurde in Abbildung 17 und Tabelle 9 zusammengefasst.

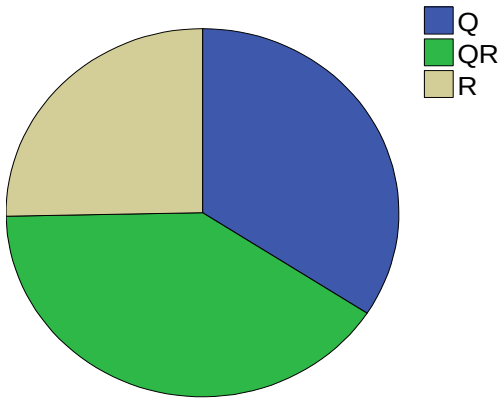


Abb. 17: Verteilung der Leptinrezeptorgenotypen am Codon 223 im Patientenkollektiv mit ASH. Q= Homozygot QQ, QR= Heterozygot, R= Homozygot RR.

Tabelle 9: Verteilung der Genotypen im Patientenkollektiv mit Alkoholischen Fettleberer-krankung

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Genotyp	QQ	27	34,2	34,2	34,2
	QR	32	40,5	40,5	74,7

	RR	20	25,3	25,3	100,0
	Gesamt	79	100,0	100,0	

4.3.3 Auftreten des Q223R-Polymorphismus im Patientenkollektiv mit chronischer Hepatitis C-Infektion

Im Patientenkollektiv mit chronischer Hepatitis C wurden 302 Proben, die von paraffineingebettetem Material gewonnen wurden, analysiert.

Bei der SNP-Analyse kam es zu folgende Verteilung: 51,7 Prozent der Patienten waren heterozygot (QR) (n=152), 17,3 Prozent homozygot (R) (n=51) und 31 Prozent homozygot (Q) (n=91). In acht von den 302 Proben konnte die DNA nicht amplifiziert werden.

Die Verteilung der Genotypen wurde in Abbildung 18 und Tabelle 10 zusammengefasst.

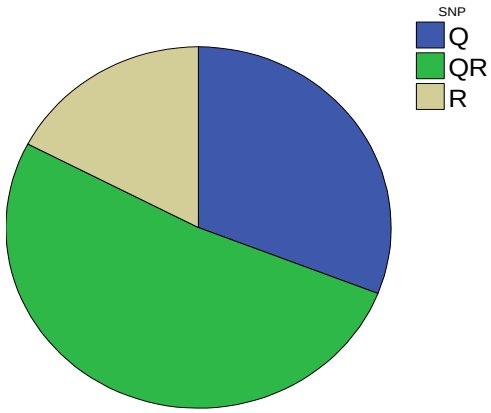


Abb. 18: Verteilung der Leptinrezeptorgenotypen am Codon 223 im Patientenkollektiv mit HCV- Infektion. Q= homozygot QQ, QR= Heterozygot, R= Homozygot RR.

Tabelle 10: Verteilung der Genotypen im Patientenkollektiv mit chronischer Hepatitis C-Infektion

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Genotyp	QQ	91	31,0	31,0	31,0
	QR	152	51,7	51,7	82,7
	RR	51	17,3	17,3	100,0

Gesamt	294	100,0	100,0	

4.4 Einfluss des Q223R-Polymorphismus auf den Entzündungsgrad, die Fibroseprogression und die Steatose bei Lebererkrankungen

4.4.1 Auftreten des Q223R-Polymorphismus im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit des Entzündungsgrades, der Fibroseprogression und der Steatose

Das Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR bei Patienten mit einer NAFLD wurde in Abhängigkeit zu dem Fibrosegrad berechnet. Der homozygote Genotyp für Q223 trat bei Patienten mit milder Fibrose (S0, S1) in nahezu 30% der Fälle auf, während Patienten mit progredienter Fibrose (S2-S4) nur zu ca. 14% den homozygoten Q223 Genotyp besaßen (vgl. Tabelle 11). Dagegen war der heterozygote Genotyp QR häufiger bei Patienten mit schwerer Fibrose. Der homozygote Genotyp 223R kam bei Patienten mit leichter und schwerer Fibrose gleich häufig vor. Es wurde für die genotypische Verteilung beim Fibroseschweregrad keine Signifikanz erreicht (p = 0,179).

Tabelle 11: Auftreten des Q223R-Genotyps im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad

			Fibrose		
			S0- S1	S2-S4	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	24	6	30
		% von Fibrose	28,9%	14,3%	24,0%
	QR	Anzahl	39	25	64
		% von Fibrose	47,0%	59,5%	51,2%
	RR	Anzahl	20	11	31
		% von Fibrose	24,1%	26,2%	24,8%
Gesamt		Anzahl	83	42	125
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

P = 0.179 (Exakter Test nach Fischer)

Nach Errechnung des odds ratio war für das Auftreten des R oder Q Allels kein signifikant erhöhtes Risiko für die Fibroseprogression vorhanden (odds ratio = 1.327; p= 0,300)

Tabelle 12: Auftreten der Q223R-Allele im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad

			Fibrose		Gesamt
			S0-S1	S2-S4	
Allel	Q	Anzahl	90	36	126
		% von Fibrose	52,6%	45,6%	50,4%
	R	Anzahl	81	43	124
		% von Fibrose	47,4%	54,4%	49,6%
Gesamt		Anzahl	171	79	250
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 1,327; p = 0,300)

Der Entzündungsgrad wurde in Abhängigkeit zu dem Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR gesetzt. Innerhalb der Genotypen gab es eine gleichmäßige Verteilung der beiden Gruppen der Entzündungsgrade G0-G1 und G2-G3. Hierbei wurde keine Signifikanz erreicht (p= 0,778).

Tabelle 13: Auftreten des Q223R Genotyps im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zur Entzündungsgrad.

			Entzündung		Gesamt
			G0-G1	G2-G3	
Genotyp	QQ	Anzahl	20	10	30
		% von Entzündung	25,6%	21,7%	24,2%
	QR	Anzahl	38	26	64
		% von Entzündung	48,7%	56,5%	51,6%
	RR	Anzahl	20	10	30
		% von Entzündung	25,6%	21,7%	24,2%
Gesamt		Anzahl	78	46	124
		% von Entzündung	100,0%	100,0%	100,0%

P = 0,778 (exakter Test nach Fischer)

Der Vergleich der Genotypen bei Patienten mit wenig Entzündung (G0-G1) und Patienten mit viel Entzündung (G2-G3) ergab keine wesentlichen Unterschiede im Auftreten des Q- und R-Allels.

Nach Errechnung des odds ratio war für das Auftreten des R- oder Q-Allels kein erhöhtes Risiko für eine Entzündung vorhanden. (odds ratio 1,184, und p= 0,525)

Tabelle 14: Auftreten der Q223R Allele im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Entzündungsgrad.

	Entzündung		Gesamt
	G0-G1	G2-G3	

Allel	Q	Anzahl	83	43	126
		% von Foci	52,5%	48,3%	51,0%
	R	Anzahl	75	46	121
		% von Foci	47,5%	51,7%	49,0%
Gesamt		Anzahl	158	89	247
		% von Foci	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 1,184; p = 0,525)

Das Autreten der Genotypen QQ, QR und RR wurde in Beziehung zu Steatosegrad 1 bzw. Steatosegrad 2-3 gesetzt. Der homozygote Genotyp 223QQ trat bei Patienten mit geringer Steatose (Ste1) in ca.18 % der Fälle auf, während Patienten mit ausgeprägter Steatose (Ste 2-3) zu ca. 28 % den homozygoten 223QQ Genotyp besaßen (vergleiche Tabelle 15). Dagegen war der heterozygote Genotyp 223QR häufiger bei Patienten mit geringer Steatose. Der homozygote Genotyp 223RR kam bei Patienten mit ausgeprägter Steatose häufiger vor. Hierbei wurde keine Signifikanz erreicht (p = 0,100).

Tabelle 15: Auftreten des Q223R Genotyps im NAFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Steatosegrad.

			Steatose		
			Ste1	Ste2-3	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	8	22	30
		% von Steatose	17,8%	27,5%	24,0%
	QR	Anzahl	29	35	64
		% von Steatose	64,4%	43,8%	51,2%
	RR	Anzahl	8	23	31
		% von Steatose	17,8%	28,8%	24,8%
Gesamt		Anzahl	45	80	125
		% von Steatose	100,0%	100,0%	100,0%

p= 0,100 (exakter Test nach Fischer)

Die Errechnung des odds ratio zeigte für das Auftreten des Q- oder R-Allels ein sehr geringes Risiko, eine Steatose zu erlangen (odds ratio=1,368 und p= 0,230). Die Daten zeigen aber keine Signifikanz.

Tabelle 16: Auftreten der Q223R Allele im NAFLD Kollektiv in Abhängigkeit zum Steatosegrad.

			Steatose		
			Ste1	Ste2-3	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	53	73	126
		% von Steatose	55,2%	47,4%	50,4%

	R	Anzahl	43	81	124
		% von Steatose	44,8%	52,6%	49,6%
Gesamt		Anzahl	96	154	250
		% von Steatose	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 1,368, p = 0,230)

4.4.2 Einfluss des Q223R Polymorphismus auf den Entzündungsgrad, die Fibroseprogression und die Steatose bei AFLD

Das Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR bei Patienten mit einer AFLD wurde in Abhängigkeit zu dem Fibrosegrad errechnet. Der homozygote Genotyp für Q223 trat bei Patienten mit milder Fibrose (S0, S1) in ca. 26 % der Fälle auf, während Patienten mit progredienter Fibrose (S2-S4) in ca. 37 % den homozygoten Q223 Genotyp besaßen (vgl. Tabelle 17). Der heterozygote Genotyp QR fand sich etwa gleich häufig bei Patienten mit leichter und schwerer Fibrose. Der homozygote Genotyp 223R trat dagegen geringfügig häufiger bei Patienten mit leichter Fibrose auf. Die niedrige Patientenzahl lassen keine statistischen Signifikanzzuweisungen zu.

Tabelle 17: Auftreten des Q223R Genotyps im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad.

			Fibrose		
			S0-S1	S2-S4	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	6	20	26
		% von Fibrose	26,1%	36,4%	33,3%
	QR	Anzahl	9	23	32
		% von Fibrose	39,1%	41,8%	41,0%
	RR	Anzahl	8	12	20
		% von Fibrose	34,8%	21,8%	25,6%
Gesamt		Anzahl	23	55	78
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

p= 0,468 (exakter Test nach Fischer)

Der Vergleich der Genotypen bei Patienten mit geringer Fibrose (S0-S1) und Patienten mit ausgeprägter Fibrose (S2-S4) ergab keine wesentlichen Unterschiede im Auftreten des Q- und R-Allels.

Nach Errechnung des odds ratio gab es für das Auftreten des R- oder Q-Allels kein erhöhtes Risiko für eine Fibrose (odds ratio = 0,627 und p= 0,186).

Tabelle18: Auftreten der Q223R-Allele im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad.

			Fibrose		
			S0-S1	S2-S4	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	21	63	84
		% von Fibrose	45,7%	57,3%	53,8%
	R	Anzahl	25	47	72
		% von Fibrose	54,3%	42,7%	46,2%
Gesamt		Anzahl	46	110	156
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

(OR= 0,627; p= 0,186)

Das Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR bei Patienten mit einer AFLD wurde in Abhängigkeit zu dem Entzündungsgrad errechnet. Der homozygote Genotyp für Q223 trat bei Patienten mit milder Entzündung (G0-G1) in ca. 21% der Fälle auf, während Patienten mit progredienter Entzündung (G2-G3) zu ca. 47% den homozygoten Genotyp 223QQ besaßen (vgl.Tabelle19). Der heterozygote Genotyp 223QR trat etwa gleich häufig in den beiden Entzündungsgruppen auf. Der homozygote Genotyp 223RR fand sich bei Patienten mit leichter Entzündung in 38,1% der Fälle und in der Gruppe mit

schwerer Entzündung in 11,1% der Fälle. Hierbei wurde Signifikanz erreicht (p = 0,008).

Tabelle 19: Auftreten des Q223R Genotyps im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Entzündungsgrad

			Entzündung		
			G0-G1	G2-G3	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	9	17	26
		% von Entzündung	21,4%	47,2%	33,3%
	QR	Anzahl	17	15	32
		% von Entzündung	40,5%	41,7%	41,0%
	RR	Anzahl	16	4	20
		% von Entzündung	38,1%	11,1%	25,6%
Gesamt		Anzahl	42	36	78
		% von Entzündung	100,0%	100,0%	100,0%

P = 0,008 (exakter Test nach Fischer)

Der Vergleich der Genotypen bei Patienten mit wenig Entzündung (G0-G1) und Patienten mit ausgeprägter Entzündung (G2-G3) ergab eine unterschiedliche Verteilung im Auftreten des Q- und R-Allels (vgl.Tabelle 20).

Nach Errechnung des odds ratio gab es für das Auftreten des Q-Allels ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Entzündung (odds ratio = 0,335 und p = 0,001).

Tabelle 20: Auftreten der Q223R Allele im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Entzündungsgrad.

			Entzündung		
			G0-G1	G2-G3	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	35	49	84
		% von Entzündung	41,7%	68,1%	53,8%
	R	Anzahl	49	23	72
		% von Entzündung	58,3%	31,9%	46,2%
Gesamt		Anzahl	84	72	156
		% von Entzündung	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 0,335, p = 0,001)

Das Autreten der Genotypen QQ, QR und RR wurde in Beziehung zum Steatosegrad 1 bzw. Steatosegrad 2-3 gesetzt. Der homozygote Genotyp 223QQ trat bei Patienten mit geringer Steatose in 36,6 % der Fälle auf, während Patienten mit ausgeprägter Steatose

(Ste 2-3) zu 29,7 % den homozygoten 223QQ Genotyp besaßen (vgl. Tabelle 21). Bei der Verteilung des heterozygoten Genotyps Q223R war ebenfalls kein großer Unterschied in Abhängigkeit zur Steatose zu erkennen (43,2% versus 39%). Der homozygote Genotyp 223RR kam auch bei Patienten mit ausgeprägter Steatose häufiger vor. Hierbei wurde keine Signifikanz erreicht (p = 0,842).

Tabelle 21: Auftreten des Q223R Genotyps im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Steatosegrad.

			Steatose		
			Ste1	Ste2- Ste3	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	15	11	26
		% von Steatose	36,6%	29,7%	33,3%
	QR	Anzahl	16	16	32
		% von Steatose	39,0%	43,2%	41,0%
	RR	Anzahl	10	10	20
		% von Steatose	24,4%	27,0%	25,6%
Gesamt		Anzahl	41	37	78
		% von Steatose	100,0%	100,0%	100,0%

p= 0,842 (Exakter Test nach Fischer)

Beim Vergleich der Genotypen bei Patienten mit wenig Steatose (Ste1) und Patienten mit ausgeprägter Steatose (Ste2-Ste3) war das Q-Allel sowohl in der Gruppe Ste1 als auch in der Gruppe Ste2-Ste3 etwas häufiger vertreten (vgl.Tabelle22).
Nach Errechnung des odds ratio gab es für das Auftreten des Q- und R-Allels kein erhöhtes Risiko für eine Steatose (odds ratio = 1,211 und p = 0,553).

Tabelle 22: Auftreten der Q223R Allele im AFLD-Kollektiv in Abhängigkeit zum Steatosegrad

			Steatose		
			Ste1	Ste2-Ste3	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	46	38	84
		% von Steatose	56,1%	51,4%	53,8%
	R	Anzahl	36	36	72
		% von Steatose	43,9%	48,6%	46,2%
Gesamt		Anzahl	82	74	156
		% von Steatose	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 1,211, p = 0,553)

4.4.3 Einfluss des Q223R-Polymorphismus auf den Entzündungsgrad und die Fibroseprogression bei chronischer Hepatitis C

Das Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR bei Patienten mit einer HCV-Infektion wurde in Abhängigkeit des Fibrosegrades errechnet. Der homozygote Genotyp 223QQ trat bei Patienten mit milder Fibrose (S0-S2) in 30,1% der Fälle auf, während Patienten mit progredienter Fibrose (S3-S4) zu 40,6% den homozygoten 223QQ-Genotyp besaßen (vgl. Tabelle 23).
Dagegen war der heterozygote Genotyp 223QR häufiger bei Patienten mit leichter Fibrose. Der homozygote Genotyp 223RR kam bei Patienten mit leichter und schwerer Fibrose gleich häufig vor. Allerdings wurde keine Signifikanz erreicht (p =0,320).

Tabelle 23: Auftreten des Q223R Genotyps im HCV-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad

			Fibrose		Gesamt
			S0S2	S3S4	
Genotyp	QQ	Anzahl	43	28	71
		% von Fibrose	30,1%	40,6%	33,5%
	QR	Anzahl	71	28	99
		% von Fibrose	49,7%	40,6%	46,7%
	RR	Anzahl	29	13	42
		% von Fibrose	20,3%	18,8%	19,8%
Gesamt		Anzahl	143	69	212
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

p= 0,320 (Exakter Test nach Fischer)

Nach Errechnung des odds-ratio war für das Auftreten des R- oder Q-Allels kein erhöhtes Risiko für die Fibroseprogression vorhanden (odds ratio = 0,782, p = 0,245).

Tabelle 24: Auftreten der Q223R-Allele im HCV-Kollektiv in Abhängigkeit zum Fibrosegrad.

			Fibrose		
			S0S2	S3S4	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	157	84	241
		% von Fibrose	54,9%	60,9%	56,8%
	R	Anzahl	129	54	183
		% von Fibrose	45,1%	39,1%	43,2%
Gesamt		Anzahl	286	138	424
		% von Fibrose	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 0,782, p = 0,245)

Das Auftreten der Genotypen QQ, QR und RR wurde in Abhängigkeit des Entzündungsgrades errechnet. Der homozygote Genotyp Q223 trat bei Patienten mit mäßiger Entzündung (G1-G2) in ca. 35% der Fälle auf, während Patienten mit starker Entzündung (G3-G4) zu ca. 20% den homozygoten Q223-Genotyp besaßen (vgl. Tabelle 25). Dagegen war der heterozygote Genotyp QR häufiger bei Patienten mit starker Entzündung. Der homozygote Genotyp 223R kam bei Patienten mit leichter und schwerer Entzündung etwa gleich häufig vor. Allerdings wurde keine Signifikanz erreicht (p = 0,191).

Tabelle 25: Auftreten des Q223R-Genotyps im HCV-Kollektiv in Abhängigkeit zum Entzündungsgrad.

			Entzündung		
			G1-G2	G3-G4	Gesamt
Genotyp	QQ	Anzahl	63	7	70
		% von Entzündung	35,6%	21,2%	33,3%
	QR	Anzahl	79	20	99
		% von Entzündung	44,6%	60,6%	47,1%
	RR	Anzahl	35	6	41
		% von Entzündung	19,8%	18,2%	19,5%
Gesamt		Anzahl	177	33	210
		% von Entzündung	100,0%	100,0%	100,0%

P = 0,191 (exakter Test nach Fischer)

Der Vergleich der Patientengruppen mit wenig bis mäßig Entzündung (G1-G2) und Patienten mit viel Entzündung (G3-G4) ergab keine wesentlichen Unterschiede im Auftreten des Q- und R-Allels.

Nach Errechnung des Odds-Ratio war für das Auftreten des R- oder Q-Allels kein erhöhtes Risiko für Entzündung vorhanden (odds ratio = 1,295 und p = 0,336).

Tabelle 26: Auftreten der Q223R-Allele im HCV-Kollektiv in Abhängigkeit zum Entzündungsgrad.

			Entzündung		
			G1-G2	G3-G4	Gesamt
Allel	Q	Anzahl	205	34	239
		% von Entzündung	57,9%	51,5%	56,9%
	R	Anzahl	149	32	181
		% von Entzündung	42,1%	48,5%	43,1%
Gesamt		Anzahl	354	66	420
		% von Entzündung	100,0%	100,0%	100,0%

(OR = 1,295, p = 0,336)

5 Diskussion

5.1 Verteilung der Genotypen und Allele des Q223R-Leptinrezeptorgens in den Patientenkollektiven

In der vorgelegten Arbeit wurde die folgende Genotypverteilung im Probandenkollektiv bestimmt: QQ 27,8%, QR 55,5% und RR 16,7%. Demgegenüber wurde in anderen Studien eine abweichende Verteilung der homozygoten Genotypen QQ und RR gefunden [43, 104]. Während bei den eigenen Daten der RR-Genotyp 16 % ausmachte, sind nach den Angaben des NCBI (National Center for Biotechnology Information) fast 30% [43] und nach der Studie von Wauters 23% RR-homozygot für das R-Allel.

Der Unterschied könnte sich darin begründen, dass bei der Genotyp-Erhebung eine Auswahl der Kohorte durchgeführt wurde. So beziehen sich die Daten von Wauters et al. nur auf übergewichtige und adipöse Frauen.

In den Daten des NCBI wurde aber keine Auswahl der Personen getroffen, sondern hier handelte es sich um ein europäisches Kollektiv.

Bei den vorgelegten Erhebungen wurde im Vergleich zu den bereits publizierten Studien eine fast gleiche Probenzahl für den Leptinrezeptor-Genotyp untersucht, so dass der Grund der abweichenden Genotypverteilung nicht in einer unterschiedlichen Kollektivgröße zu suchen ist.

Eine weitere Ursache für Unterschiede in den Ergebnissen der Genotypisierung könnte in technischen Schwierigkeiten bei der Detektion der Allele liegen. Bei den durchgeführten Etablierungsarbeiten zeigte sich, dass die VIC-Fluoreszenz bei der Sondenhybridisierung schwächere Signale ergab und daher oft schwierig zu interpretieren war. Da in der eigenen Arbeit aber das Q-Allel durch die VIC-Sonde dargestellt wurde, kann eine fehlende Detektion hier nicht für den unterrepräsentierten RR-Genotyp verantwortlich sein.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Verteilung der Genotypen des Q223R-Leptinreceptorgens in den Probanden- und Patientenkollektiven.

Genotyp	Probanden	NAFLD	AFLD	HCV
QQ	27,8 %	23,4 %	34,2 %	31,0 %
QR	55,5 %	51,8 %	40,5 %	51,7 %
RR	16,7 %	24,8 %	25,3 %	17,3 %

Betrachtet man jedoch im Vergleich zu den untersuchten Probanden das NAFLD-Kollektiv, so findet man hier eine Genotypverteilung, die den Daten von Wauters et al. entspricht.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Verteilung der Allele des Q223R-Leptinrezeptorgens in den Patientenkollektiven.

Allel	Probanden	NAFLD	AFLD	HCV
Q	55,5 %	49,3 %	54,4 %	56,8 %
R	44,5 %	50,7 %	45,6 %	43,2 %

Gesamtverteilung der Allele in allen Patientenkollektiven (1546 Allele, n = 773)

Allel	Gesamt
Q	54,8 %
R	45,2 %

Betrachtet man die Allelverteilung in dem Patientenkollektiv, so trat das Q-Allel in 55.5% der Fälle und das R-Allel in 44,5% der Fälle auf. In früheren Studien wurde eine geringfügig abweichende Allelhäufigkeit beobachtet. Während im eigenem Probandenkollektiv die Häufigkeit des R-Allels 44,5% ausmachte, war die Häufigkeit des R-Allels im Kollektiv von Wauters et al 48,5% [104] und im Kollektiv des NBCI mit ca. 55% (54,2 - 55,1) jeweils höher [43].

In einer Megastudie von Paracchini et al., in der 18 Studien zusammengefasst wurden, wurde festgestellt, dass die Häufigkeit des R-Allels signifikant in den Kollektiven zwischen ethnischen Gruppen variiert [70]. Das kaukasische Gesamtkollektiv mit 3309

Teilnehmern bestand insgesamt aus zehn Einzelkollektiven. Die Häufigkeit des R-Allels variierte in den Kollektiven zwischen 41% und 58%, mit einem Durchschnitt von 45%. Daher liegt das Ergebnis der vorgelegten Arbeit sowie die Ergebnisse der NBCI-Referenz und des Wauters-Kollektivs im Bereich der auftretenden Variation, die in dem Gesamtkollektiv der Megastudie gefunden wurde.

Diese Daten von Paracchini et al. bestätigen daher die hier vorgelegten Ergebnisse. Ein weiteres Argument für die Richtigkeit der vorgelegten Daten, ist der Einsatz von definierten Positivkontrollen, die durch Klonierung hergestellt und durch Sequenzierung geprüft wurden. Die Positivkontrollen wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, für die Etablierung der SNP-Analyse eingesetzt, aber auch bei jedem Lauf als interne Kontrollen mitgeführt. Ebenfalls wurden die Anforderungen des SNPs-Designs, wie von Stickel und Österreicher beschrieben, erfüllt [99].

5.2 Auftreten der Q223R-Genotypen und Allele des Leptinrezeptors bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

In den zu untersuchenden Kollektiven wurden der Genotyp und das einzelne Allel in Beziehung zu Fibrose, Entzündung und Steatose gesetzt. Es wurden Patientenkollektive mit NAFLD, AFLD oder chronischen HCV-Infektion untersucht.

Im gesamten NAFLD-Kollektiv waren die Genotypen und das Allel normal verteilt (vgl. 5.1) [43]. Ein erhöhtes Auftreten des Q- oder des R-Allels in Patienten mit ausgeprägter Fibrose, hohem Entzündungsgrad oder vermehrter Steatose konnte nicht gefunden werden.

Auch in dem HCV-Kollektiv konnte keine signifikante Assoziation eines Genotyps des Leptinrezeptors mit den histologischen Parametern der Fibrose, Entzündung oder Steatose gefunden werden. Demgegenüber wurde bei Patienten des AFLD-Kollektivs, die den QQ-Genotyp besaßen, geringfügig häufiger eine ausgeprägte Fibrose verzeichnet, allerdings wurde keine Signifikanz erreicht.

Dagegen zeigte sich bei Betrachtung des Entzündungsgrads, dass Patienten mit hohem Entzündungsgrad häufiger das Q-Allel besaßen und auch häufiger homozygot für das Q-Allel waren. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der Leptinrezeptor, der auf dem Q-Allel kodiert wird, die Entzündungsvorgänge beinflußt.

Bereits bei anderen Erkrankungen konnte eine Assoziation des Q- oder R-Allels des Leptinrezeptors mit dem Krankheitsverlauf beobachtet werden. Da die Leptinkommunikation eine zentrale Rolle bei der Interaktion des Insulingleichgewichts und dem Fettstoffwechsel besitzt (Abb. 19), wurde in der Gruppe des "The Finish Diabetes Prevention Study" die Auswirkungen des Q223R-Polymorphismus auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit gestörter Glukosetoleranz (IGT, Impaired Glucose Tolerance) bei Vorliegen des 223QQ-Genotyps häufiger eine Diabetes mellitus Typ 2 entwickeln als Patienten, die ein 223R-Allel tragen [84].

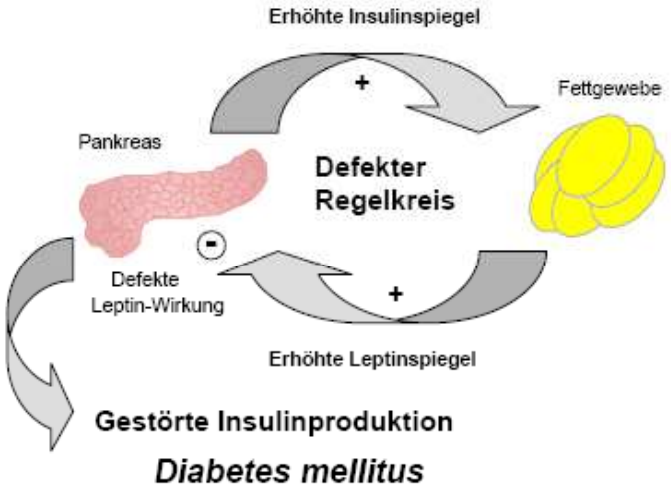


Abb. 19: Bedeutung des Leptins für die Fettsucht und den Diabetes mellitus: Die fehlende Leptinwirkung an den ß-Zellen des Pankreas führt zu Hyperinsulinämie, die dann wiederum für die Adipogenese stimuliert und für eine Vermehrung des Fettgewebes verantwortlich ist. Das vermehrte Fettgewebe hat einen erhöhten Leptinspiegel zur Folge, die zur Desentivierung der Leptinsignale führt. Letztendlich kommt es durch den *circulus vitiosus* zur ß-Zelldysfunktion mit gestörter Insulinproduktion und folgender Diabetes mellitus. *(nach [92]; entnommen aus der Dissertation von K. Laubner, Med. Fakultät der Universität Würzburg, 2005)*

Auch wurde beobachtet, dass Patienten aus diesem Kollektiv mit dem QQ-Genotyp eher von einer Änderung des Lebensstils profitieren können als andere Genotypen, um einer Diabetes Typ 2 vorzubeugen. Damit kann der Q223R-Polymorphismus als ein wichtiger Einflussfaktor bei IGT-Patienten gesehen werden.

Auch in der Arbeit von Chiu et al. wurde die Auswirkung des Q223R-Polymorphismus auf die Insulinsensitivität untersucht [14]. Hierbei zeigte sich, dass Patienten, die ein R-Allel besaßen ein erhöhtes Risiko für das Metabolische Syndrom haben. Patienten, die mindestens ein R-Allel besaßen, hatten höhere Gesamt- und LDL-Cholesterolwerte,

sowie höhere Insulin- und Glukosekonzentrationen im oralen Glukosetoleranztest. Daher könnte das R-Allel ein Risikofaktor für eine Insulinresistenz sein.

In der Arbeit von Rosmond et al. wurde der Einfluss des Leptinrezeptors auf den Blutdruck untersucht [83]. Hierbei konnte ein signifikant niedriger systolischer und diastolischer Blutdruck bei den homozygoten 223RR-Genotypen im Vergleich zu den homozygoten 223QQ-Genotypen beobachtet werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Leptin nach Stimulierung des Leptinrezeptors in die Blutdruckregulation involviert ist. Dabei könnte der 233RR-Genotyp des Leptinrezeptors eine schützende Wirkung auf die Hypertonie haben. Da Fettsucht häufig mit Hypertonie verbunden ist [54], schlägt Rosmond et al. vor, dass das Auftreten des R-Allels mitverantwortlich sei, dass nicht alle fettsüchtigen Patienten unter Hypertonie leiden [83].Die Bedeutung des Leptinsignalweges für die Fettsucht konnte erstmals in Knock-out Mäusen gezeigt werden [38]. Bei fettsüchtigen Menschen wurden ebenfalls erhöhte Serum-Leptinwerte nachgewiesen [17]. Die Rolle des Leptins für die Fettsucht ist in Abb. 20 dargestellt.

Die interagierende Rolle des Leptinsignalweges lässt erkennen, dass ein angenommener funktioneller Einfluss des Q223R-Leptinrezeptor-Polymorphismus vielfältige Auswirkungen im Glukosestoffwechsel und im Fetthaushalt haben würde. Portoles et al. legte dar, dass das Q-Allel häufiger in fettleibigen Patienten zu finden sei, während das R-Allel häufiger in der Kontrollgruppe vorkam [75]. Daher stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen des Leptinrezeptors und Fettsucht besteht. Dies wurde in einer Meta-Analyse von Heo et al. untersucht. Hierbei konnte trotz der großen Teilnehmerzahl kein Zusammenhang zwischen den Aminosäureaustauschen K109R, K656N, und Q223R des Leptinrezeptors und vermehrter Fettsucht gefunden werden [40].

Auch die Ergebnisse an unserem NAFLD-Kollektiv deuten darauf hin, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines bestimmten Allels des Leptinrezeptors und dem Fettstoffwechsel gibt, denn auch hier zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Auftreten des Q223R-Polymorphismus und vermehrter Steatose in der Leber.

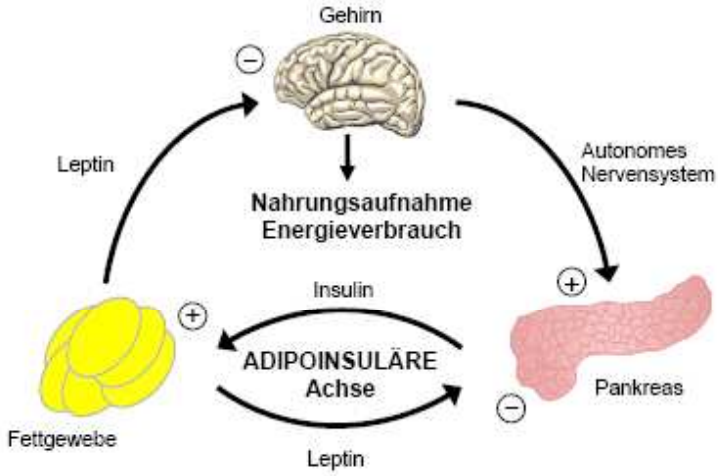


Abb. 20: Rolle des Leptins in adiposinsulären Achse: Insulin stimuliert die Leptinsynthese im Fettgewebe. Leptin hemmt die Insulinsekretion in ß-Zellen des Pankreas. Diese Signalübertragung integriert die Kopplung von Glukosehomöostase und Fettgewebsstatus in den Regelkreis der Steuerung des Energiehaushaltes durch Leptin. Im Hypothalamus wird die Nahrungsaufnahme durch Leptin gehemmt und der Energiehaushalt stimuliert. *(nach [92]; entnommen aus der Dissertation von K. Laubner, Med. Fakultät der Universität Würzburg, 2005)*

Nicht nur in Vorgängen des Glukose- und Fettstoffwechsels, sondern auch im Bereich der Pathogenese von Tumoren besteht die Hypothese, dass der Q223R-Polymorphismus von Bedeutung ist [97]. Eine signifikante Assoziation zwischen dem heterozygoten Auftreten des Q223R-Genotyps, zwischen dem homozygoten Auftreten des 223RR-Genotyps und dem Auftreten von Mammakarzinomen wurde in einer Studie von Snoussi et al. gefunden [97]. Außerdem war die Anwesenheit des R-Allels mit einer verminderten Gesamt-Überlebensrate assoziiert.

Neuere Studien weisen darauf hin, dass Leptin sowohl ein mitogener, als auch proangiogenetischer Faktor in verschiedenen Zellmodellen ist [101]. Auch konnte dokumentiert werden, dass humane Mammakarzinom-Zelllinien und Mammatumore Leptin und Leptinrezeptoren exprimieren können [8, 44, 49, 55]. In anderen Studien wiederum wurde kein Zusammenhang zwischen dem Q223R-Polymorphismus und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms gefunden [108].

In der Studie von Snoussi et al. wird der A/G-Polymorphismus an Position -2548 des Peptinrezeptorgens betrachtet. Patientinnen, die ein A-Allel besitzen, haben ein deutlich erhöhtes Risiko für das Mammakarzinom. Bei homozygotem Auftreten des A-Allels zeigte sich ein dreifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms.

Prognostisch ist ebenfalls das A-Allel mit einer größeren Tumorgröße zum Diagnosezeitpunkt und mit einer kürzeren, krankheitsfreien Überlebenszeit verbunden [97]. Diese Daten unterstreichen den Einfluss der genetischen Varianten des Leptinrezeptors bei der Mammakarzinogenese.

5.3 Bedeutung der Allelvarianz für den Leptinsignalweg

Insgesamt geben frühere Studien kein eindeutiges Bild über die pathophysiologische Rolle des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors. Beide Metastudien [40, 70] sehen keinen Zusammenhang mit dem Risiko für die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms, während Einzelberichte durchaus eine Assoziation mit dem Q-Allel und Fettsuchterkrankungen und eine Assoziation des R-Allels mit Tumorerkrankungen sehen (zusammengefasst in Abb. 21).

Diese widersprüchlichen Daten sprechen dafür, dass durch die komplexe Einbindung des Leptinsignalweges in vielfältige Stoffwechselwege sich der funktionelle Einfluss des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors unterschiedlich darstellt. Bislang sind keine Studien bekannt, in denen der Einfluss des Leptinrezeptors bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen untersucht wurde.

Die eigene Arbeit hat diese Fragestellung erstmals angegangen und zeigt auch hier kein einheitliches Bild bei den chronischen Lebererkrankungen AFLD, NAFLD oder der chronischen HCV-Infektion.

Während man bei der AFLD eine signifikante Assoziation des Entzündungsgrades mit dem Q-Allel findet, ist das bei der NAFLD oder der HCV-Erkrankung nur trendweise oder gar nicht zu beobachten. Möglicherweise wird gerade bei der NAFLD oder der HCV-Hepatitis dieser Aspekt durch andere Parameter verdeckt.

Es ist bekannt, dass Leptin in entzündlichen Prozessen den JAK/STAT-Weg am Leptinrezeptor stimuliert [100] und so den proinflammatorischen und profibrogenen Prozess begünstigt [48]. Leptin hat die Fähigkeit, die TIMP-1-Genexpression zu stimulieren und die TIMP-1-Produktion in aktivierten Hepatischen Sternzellen, die als die zentralen Zellen der Fibrogenese gelten, zu erhöhen. Dieser Effekt geht einher mit einer erhöhten

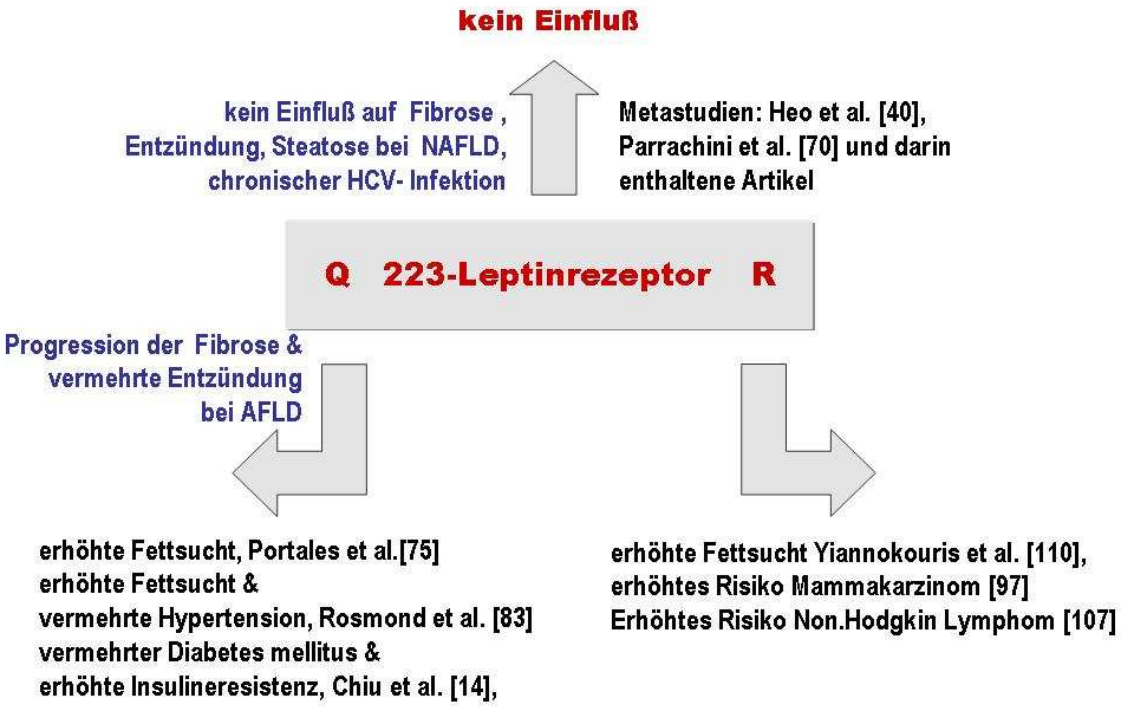


Abb. 21: Zusammenfassende Darstellung zu Studien über den pathophysiologischen Einfluss des Q223R-Polymorphismus des Leptinrezeptors (in Blau: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in Schwarz: Ergebnisse früherer Studien).

Phosphorylierung der Leptin-Signaltransduktoren, sowohl von JAK1 und JAK2, als auch von STAT3 und STAT5, und ist begleitet von einer erhöhten Phosphorylierung des Leptinrezeptors [9]. Es wurde von Neeraj et al nachgewiesen, dass es nach Aktivierung des Leptinrezeptors zu einer Erhöhung der Collagen I-Expression kommt. Auch konnte man zeigen, dass Leptin von aktivierten HSC produziert wurde [86].

Da der Leptinsignalweg in entzündliche Prozesse der Leber involviert ist, unterstreichen die Ergebnisse am AFLD-Kollektiv die Hypothese, dass der Q/R-Aminosäureaustausch im Leptinrezeptorgen auch bei der Aktivität der proinflammatorischen Signale des Leptins von Bedeutung ist.

Zukünftige Meta-Studien an besser charakterisierten Patientkollektiven mit chronischer Lebererkrankung, in denen die wesentlichen, den Krankheitsverlauf beeinflussenden Faktoren bekannt sind, sind notwendig, um die Riskioparameter aufzuschlüsseln und

den möglichen Einfluß des Leptinrezeptorpolymorphismus unter Berücksichtigung wechselseitiger Interaktionen zu definieren.

6 Zusammenfassung

In Deutschland sind 3,5 Millionen Menschen von Lebererkrankungen betroffen. Die alkoholtoxische Leberschädigung, Fettlebererkrankungen und die Hepatitis-C Infektion gehören zu den wichtigen Ursachen eines chronischen Verlaufes, der durch stetige Vernarbungsprozesse gekennzeichnet ist und zu einem fibrotischen Umbau der Leber führt. Die Leberzirrhose als Endstadium der fibrotischen Umstrukturierung der Leber wird unterschiedlich schnell erreicht und hängt von zusätzlichen leberschädigenden Risikofaktoren ab. Jüngste Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung des Leptin-Signalweges fibrogene Mechanismen bei experimenteller toxischer Hepatitis stimuliert.

In der vorgelegten Arbeit wurde der genetische Polymorphismus Q223R im Gen des Leptinrezeptors als möglicher beeinflußender Faktor für die Progression der Leberschädigung untersucht. Das Gen des Leptinrezeptors liegt innerhalb des Chromosomenlokus 1p31. Ein Punktmutationspolymorphismus führt zu einem Aminosäureaustausch Glutamin [Q] zu Arginin [R] an Position 223, der möglicherweise mit einem erhöhten Risiko der Insulinresistenz und der Fettsucht assoziiert ist. Über die Auswirkung des Polymorphimus auf die profibrogenen Signalwege des Leptins bei chronischen, fibrotischen Erkrankungen lagen bislang keine Studien vor. Für die hier vorgelegten Untersuchungen des Polymorhismus wurde die Glutamin- und die argininkodierende Sequenz kloniert, um als Kontrollsystem bei der allelischen Diskriminierung zu fungieren. Die Differenzierung der Allele wurde mit fluoreszenzenmarkierten Minor Groove Binder-(MGB) Sonden in einem Real-Time-PCR-Assay etabliert. Nach erfolgreicher Detektion geringer Kopienzahlen (10000 Kopien) beider Allelformen wurde der Ansatz auf DNA, die aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben stammte, übertragen. Für die Untersuchungen wurde 137 Patientenproben mit nichtalkoholtoxischer (NAFLD), 79 Proben mit alkoholtoxischer (AFLD) und 294 Proben mit chronischer HCV-positiver Hepatitis herangezogen. Daneben wurde der Polymorphismus von 263 gesunden Blutspendern bestimmt und die folgende Genotypverteilung nachgewiesen QQ 27,8%, QR 55,5% und RR 16,7%. In den Patienten mit chronischen Lebererkrankungen kam es zu einer ähnlichen Verteilung. 54,8% der untersuchten Personen (n=773) besaßen das Q-Allel und 45,2 % das R-Allel. Diese Verteilung entsprach den Literaturangaben in der europäischen Bevölkerung. Im Weiteren wurde die Genotyp- und Allelverteilung in Verbindung der pathologischen Angaben zum Schweregrad der entzündlichen Leberveränderungen, dem Fibrosestadium und der Steatose betrachtet. Weder das Q-Allel noch das R-Allel trat bei fortgeschrittenen NAFLD- oder HCV-assosziierten Hepatitiden häufiger auf als bei Patienten im Anfangsstadium. Genotypen mit dem Q-Allel

wurden aber signifikant häufiger in Proben von AFLD-Patienten mit hohem Entzündungsgrad nachgewiesen. Ein funktioneller Einfluß der Q223R-Polymorpismus des Leptinrezptors bei AFLD -Patienten wird daher diskutiert, der möglicherweise bei HCV oder NAFLD-Patienten durch andere beeinflussende Parameter überlagert ist.

7 Referenzen

1. Ahima, R.S. and J.S. Flier, Leptin. *Annu Rev Physiol,* 62: p. *413-37*; 2000.
2. Alter, M.J. and E.E. Mast, The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am,* 23(3): p. *437-55*; 1994.
3. Bachem, M.G., K.M. Sell, R. Melchior, J. Kropf, T. Eller, and A.M. Gressner, Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol,* 63(2): p. *123-30*; 1993.
4. Bacon, B.R., M.J. Farahvash, C.G. Janney, and B.A. Neuschwander-Tetri, Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology,* 107(4): p. *1103-9*; 1994.
5. Bellentani, S., G. Bedogni, L. Miglioli, and C. Tiribelli, The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 16(11): p. *1087-93*; 2004.
6. Berg, T. *Habilitation: Chronische Hepatitis C - Therapeutische Strategien, molekulare Resistenzmechanismen und Relevanz neuer Hepatitis-assoziierter Viren -.* 2002 [cited.
7. Bjorbaek, C., J.K. Elmquist, P. Michl, R.S. Ahima, A. van Bueren, A.L. McCall, and J.S. Flier, Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology,* 139(8): p. *3485-91*; 1998.
8. Caldefie-Chezet, F., M. Damez, M. de Latour, G. Konska, F. Mishellani, C. Fusillier, M. Guerry, F. Penault-Llorca, J. Guillot, and M.P. Vasson, Leptin: a proliferative factor for breast cancer? Study on human ductal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun,* 334(3): p. *737-41*; 2005.
9. Cao, Q., K.M. Mak, C. Ren, and C.S. Lieber, Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H2O2-dependant MAPK pathways. *J Biol Chem,* 279(6): p. *4292-304*; 2004.
10. Caprio, M., E. Fabbrini, A.M. Isidori, A. Aversa, and A. Fabbri, Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab,* 12(2): p. *65-72*; 2001.
11. Castilla, A., J. Prieto, and N. Fausto, Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med,* 324(14): p. *933-40*; 1991.
12. Ceddia, R.B., H.A. Koistinen, J.R. Zierath, and G. Sweeney, Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *Faseb J,* 16(10): p. *1163-76*; 2002.
13. Chitturi, S. and G.C. Farrell, Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis,* 21(1): p. *27-41*; 2001.
14. Chiu, K.C., A. Chu, L.M. Chuang, and M.F. Saad, Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance. *Eur J Endocrinol,* 150(5): p. *725-9*; 2004.

15. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science,* 244(4902): p. *359-62*; 1989.

16. Chung, W.K., L. Power-Kehoe, M. Chua, F. Chu, L. Aronne, Z. Huma, M. Sothern, J.N. Udall, B. Kahle, and R.L. Leibel, Exonic and intronic sequence variation in the human leptin receptor gene (LEPR). *Diabetes,* 46(9): p. *1509-11*; 1997.

17. Considine, R.V., M.K. Sinha, M.L. Heiman, A. Kriauciunas, T.W. Stephens, M.R. Nyce, J.P. Ohannesian, C.C. Marco, L.J. McKee, T.L. Bauer, and et al., Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med,* 334(5): p. *292-5*; 1996.

18. Czaja, M.J., F.R. Weiner, K.C. Flanders, M.A. Giambrone, R. Wind, L. Biempica, and M.A. Zern, In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol,* 108(6): p. *2477-82*; 1989.

19. Dancygier, H., Pathogenese und Therapie der nichtalkoholischen Fettleberer-krankungen: Von der Fettleber zur Zirrhose. *Deutsches Ärzteblatt,* 103(19); 2006.

20. Day, C.P. and O.F. James, Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology,* 114(4): p. *842-5*; 1998.

21. de Silva, A.M., K.R. Walder, T.J. Aitman, T. Gotoda, A.P. Goldstone, A.M. Hodge, M.P. de Courten, P.Z. Zimmet, and G.R. Collier, Combination of polymorphisms in OB-R and the OB gene associated with insulin resistance in Nauruan males. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 23(8): p. *816-22*; 1999.

22. de Silva, A.M., K.R. Walder, E.J. Boyko, K.F. Whitecross, G. Nicholson, M. Kotowicz, J. Pasco, and G.R. Collier, Genetic variation and obesity in Australian women: a prospective study. *Obes Res,* 9(12): p. *733-40*; 2001.

23. Devos, R., Y. Guisez, J. Van der Heyden, D.W. White, M. Kalai, M. Fountoulakis, and G. Plaetinck, Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem,* 272(29): p. *18304-10*; 1997.

24. Diehl, A.M., Z. Goodman, and K.G. Ishak, Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology,* 95(4): p. *1056-62*; 1988.

25. Dollinger, M. *Aus dem Vortrag: Aktualisierte Leitlinien zur Hepatitis C, Kompetensnetz Hepatitis*. 2005 [cited.

26. Drenick, E.J., J. Fisler, and D. Johnson, Hepatic steatosis after intestinal bypass--prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology,* 82(3): p. *535-48*; 1982.

27. Echwald, S.M., T.D. Sorensen, T.I. Sorensen, A. Tybjaerg-Hansen, T. Andersen, W.K. Chung, R.L. Leibel, and O. Pedersen, Amino acid variants in the human leptin receptor: lack of association to juvenile onset obesity. *Biochem Biophys Res Commun,* 233(1): p. *248-52*; 1997.

28. Endo, K., H. Yanagi, C. Hirano, H. Hamaguchi, S. Tsuchiya, and S. Tomura, Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene

and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 24(4): p. *443-9*; 2000.

29. Falchuk, K.R., S.C. Fiske, R.C. Haggitt, M. Federman, and C. Trey, Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology,* 78(3): p. *535-41*; 1980.

30. Feldstein, A.E., A. Canbay, P. Angulo, M. Taniai, L.J. Burgart, K.D. Lindor, and G.J. Gores, Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology,* 125(2): p. *437-43*; 2003.

31. Flier, J.S. and E. Maratos-Flier, Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell,* 92(4): p. *437-40*; 1998.

32. Fong, T.M., R.R. Huang, M.R. Tota, C. Mao, T. Smith, J. Varnerin, V.V. Karpitskiy, J.E. Krause, and L.H. Van der Ploeg, Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol,* 53(2): p. *234-40*; 1998.

33. Fromenty, B., M.A. Robin, A. Igoudjil, A. Mansouri, and D. Pessayre, The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab,* 30(2): p. *121-38*; 2004.

34. Fruhbeck, G., S.A. Jebb, and A.M. Prentice, Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol,* 18(5): p. *399-419*; 1998.

35. Garcia-Monzon, C., E. Martin-Perez, O.L. Iacono, M. Fernandez-Bermejo, P.L. Majano, A. Apolinario, E. Larranaga, and R. Moreno-Otero, Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol,* 33(5): p. *716-24*; 2000.

36. Gotoda, T., B.S. Manning, A.P. Goldstone, H. Imrie, A.L. Evans, A.D. Strosberg, P.M. McKeigue, J. Scott, and T.J. Aitman, Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum Mol Genet,* 6(6): p. *869-76*; 1997.

37. Gressner, A.M. and M.G. Bachem, Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis,* 10(1): p. *30-46*; 1990.

38. Halaas, J.L., K.S. Gajiwala, M. Maffei, S.L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R.L. Lallone, S.K. Burley, and J.M. Friedman, Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science,* 269(5223): p. *543-6*; 1995.

39. Henryk, D., *Die nichtalhoholische Steatohepatitis*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2001. p. 2511-2516.

40. Heo, M., R.L. Leibel, K.R. Fontaine, B.B. Boyer, W.K. Chung, M. Koulu, M.K. Karvonen, U. Pesonen, A. Rissanen, M. Laakso, M.I. Uusitupa, Y. Chagnon, C. Bouchard, P.A. Donohoue, T.L. Burns, A.R. Shuldiner, K. Silver, R.E. Andersen, O. Pedersen, S. Echwald, T.I. Sorensen, P. Behn, M.A. Permutt, K.B. Jacobs, R.C. Elston, D.J. Hoffman, E. Gropp, and D.B. Allison, A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 26(5): p. *640-6*; 2002.

41. Hopf, U., B. Moller, D. Kuther, R. Stemerowicz, H. Lobeck, A. Ludtke-Handjery, E. Walter, H.E. Blum, M. Roggendorf, and F. Deinhardt, Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol,* 10(1): p. *69-76*; 1990.

42. Hourigan, L.F., G.A. Macdonald, D. Purdie, V.H. Whitehall, C. Shorthouse, A. Clouston, and E.E. Powell, Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology,* 29(4): p. *1215-9*; 1999.

43. http://www99.mh-hannover.de/institute/pathologie/dgp/Z_Tagung_DGP.html.

44. Hu, X., S.C. Juneja, N.J. Maihle, and M.P. Cleary, Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst,* 94(22): p. *1704-11*; 2002.

45. Huang, L., Z. Wang, and C. Li, Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem,* 276(9): p. *6343-9*; 2001.

46. Hynes, G.R. and P.J. Jones, Leptin and its role in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol,* 12(3): p. *321-7*; 2001.

47. Ikejima, K., H. Honda, M. Yoshikawa, M. Hirose, T. Kitamura, Y. Takei, and N. Sato, Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology,* 34(2): p. *288-97*; 2001.

48. Ikejima, K., Y. Takei, H. Honda, M. Hirose, M. Yoshikawa, Y.J. Zhang, T. Lang, T. Fukuda, S. Yamashina, T. Kitamura, and N. Sato, Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology,* 122(5): p. *1399-410*; 2002.

49. Ishikawa, M., J. Kitayama, and H. Nagawa, Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res,* 10(13): p. *4325-31*; 2004.

50. Kellerer, M., M. Koch, E. Metzinger, J. Mushack, E. Capp, and H.U. Haring, Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia,* 40(11): p. *1358-62*; 1997.

51. Kleiner, D.E., E.M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M.J. Contos, O.W. Cummings, L.D. Ferrell, Y.C. Liu, M.S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A.J. McCullough, and A.J. Sanyal, Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology,* 41(6): p. *1313-21*; 2005.

52. Knittel, T., T. Janneck, L. Muller, P. Fellmer, and G. Ramadori, Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology,* 24(2): p. *352-60*; 1996.

53. Koh, J.M., D.J. Kim, J.S. Hong, J.Y. Park, K.U. Lee, S.Y. Kim, and G.S. Kim, Estrogen receptor alpha gene polymorphisms Pvu II and Xba I influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men. *Eur J Endocrinol,* 147(6): p. *777-83*; 2002.

54. Landsberg, L., Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q J Med,* 61(236): p. *1081-90*; 1986.

55. Laud, K., I. Gourdou, L. Pessemesse, J.P. Peyrat, and J. Djiane, Identification of leptin receptors in human breast cancer: functional activity in the T47-D breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol,* 188(1-2): p. *219-26*; 2002.

56. Lissen, E., H.J. Alter, M.A. Abad, Y. Torres, M. Perez-Romero, M. Leal, J.A. Pineda, R. Torronteras, and A. Sanchez-Quijano, Hepatitis C virus infection among sexually promiscuous groups and the heterosexual partners of hepatitis C virus infected index cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 12(11): p. *827-31*; 1993.

57. Long, G.S., B.R. Bacon, and A.M. Bisceglie, Interpreting serologic tests for hepatitis C virus infection: balancing cost and clarity. *Cleve Clin J Med,* 63(5): p. *264-8*; 1996.

58. Madan, K., V. Gopalkrishna, P. Kar, J.K. Sharma, U.P. Das, and B.C. Das, Detection of hepatitis C and E virus genomes in sera of patients with acute viral hepatitis and fulminant hepatitis by their simultaneous amplification in PCR. *J Gastroenterol Hepatol,* 13(2): p. *125-30*; 1998.

59. Mammes, O., R. Aubert, D. Betoulle, F. Pean, B. Herbeth, S. Visvikis, G. Siest, and F. Fumeron, LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. *Eur J Clin Invest,* 31(5): p. *398-404*; 2001.

60. Marcellin, P., Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol,* 31 Suppl 1: p. *9-16*; 1999.

61. Matsuoka, N., Y. Ogawa, K. Hosoda, J. Matsuda, H. Masuzaki, T. Miyawaki, N. Azuma, K. Natsui, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, S. Nishi, D.B. Thompson, and K. Nakao, Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia,* 40(10): p. *1204-10*; 1997.

62. Mattevi, V.S., V.M. Zembrzuski, and M.H. Hutz, Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 26(9): p. *1179-85*; 2002.

63. Milani, S., H. Herbst, D. Schuppan, H. Stein, and C. Surrenti, Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *Am J Pathol,* 139(6): p. *1221-9*; 1991.

64. Murakami, T., T. Yamashita, M. Iida, M. Kuwajima, and K. Shima, A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun,* 231(1): p. *26-9*; 1997.

65. Nishiguchi, S., T. Kuroki, S. Nakatani, H. Morimoto, T. Takeda, S. Nakajima, S. Shiomi, S. Seki, K. Kobayashi, and S. Otani, Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet,* 346(8982): p. *1051-5*; 1995.

66. Nishiguchi, S., S. Shiomi, S. Nakatani, T. Takeda, K. Fukuda, A. Tamori, D. Habu, and T. Tanaka, Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet,* 357(9251): p. *196-7*; 2001.

67. Ogawa, Y., H. Masuzaki, and K. Nakao, Clinical implication of leptin, the obese gene product. *Intern Med,* 38(2): p. *210-2*; 1999.

68. Palitzsch, K.D., B. Hottentrager, K. Schlottmann, E. Frick, A. Holstege, J. Scholmerich, and W. Jilg, Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 11(11): p. *1215-20*; 1999.

69. Pappo, I., H. Becovier, E.M. Berry, and H.R. Freund, Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J Surg Res,* 51(2): p. *106-12*; 1991.

70. Paracchini, V., P. Pedotti, and E. Taioli, Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol,* 162(2): p. *101-14*; 2005.

71. Peelman, F., C. Couturier, J. Dam, L. Zabeau, J. Tavernier, and R. Jockers, Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends Pharmacol Sci,* 27(4): p. *218-25*; 2006.

72. Perez-Carreras, M., P. Del Hoyo, M.A. Martin, J.C. Rubio, A. Martin, G. Castellano, F. Colina, J. Arenas, and J.A. Solis-Herruzo, Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology,* 38(4): p. *999-1007*; 2003.

73. Pessayre, D., B. Fromenty, and A. Mansouri, Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 16(11): p. *1095-105*; 2004.

74. Pinto, H.C., A. Baptista, M.E. Camilo, A. Valente, A. Saragoca, and M.C. de Moura, Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci,* 41(1): p. *172-9*; 1996.

75. Portoles, O., J.V. Sorli, F. Frances, O. Coltell, J.I. Gonzalez, C. Saiz, and D. Corella, Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol,* 21(8): p. *605-12*; 2006.

76. Powell, E.E., W.G. Cooksley, R. Hanson, J. Searle, J.W. Halliday, and L.W. Powell, The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology,* 11(1): p. *74-80*; 1990.

77. Quinn, S.F. and B.B. Gosink, Characteristic sonographic signs of hepatic fatty infiltration. *AJR Am J Roentgenol,* 145(4): p. *753-5*; 1985.

78. Quinton, N.D., A.J. Lee, R.J. Ross, R. Eastell, and A.I. Blakemore, A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. *Hum Genet,* 108(3): p. *233-6*; 2001.

79. Rao, M.S. and J.K. Reddy, Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis,* 21(1): p. *43-55*; 2001.

80. Reed, K.E. and C.M. Rice, Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol,* 242: p. *55-84*; 2000.

81. Resnick, R.H. and R. Koff, Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalence and significance. *Arch Intern Med,* 153(14): p. *1672-7*; 1993.

82. Rooney, G. and R.J. Gilson, Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Sex Transm Infect,* 74(6): p. *399-404*; 1998.

83. Rosmond, R., Y.C. Chagnon, G. Holm, M. Chagnon, L. Perusse, K. Lindell, B. Carlsson, C. Bouchard, and P. Bjorntorp, Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab,* 85(9): p. *3126-31*; 2000.

84. Salopuro, T., L. Pulkkinen, J. Lindstrom, J.G. Eriksson, T.T. Valle, H. Hamalainen, P. Ilanne-Parikka, S. Keinanen-Kiukaanniemi, J. Tuomilehto, M. Laakso, and M. Uusitupa, Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. *Int J Obes (Lond),* 29(10): p. *1245-51*; 2005.

85. Sanyal, A.J., C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi, W.B. Rizzo, M.J. Contos, R.K. Sterling, V.A. Luketic, M.L. Shiffman, and J.N. Clore, Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology,* 120(5): p. *1183-92*; 2001.

86. Saxena, N.K., M.A. Titus, X. Ding, J. Floyd, S. Srinivasan, S.V. Sitaraman, and F.A. Anania, Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *Faseb J,* 18(13): p. *1612-4*; 2004.

87. Schirmacher, P., W.E. Fleig, and H.P. Dienes, [Biopsy diagnosis of chronic hepatitis]. *Z Gastroenterol,* 42(2): p. *175-85*; 2004.

88. Schirmacher, P., W.E. Fleig, A. Tannapfel, C. Langner, V. Dries, L. Terracciano, H. Denk, and H.P. Dienes, [Bioptic diagnosis of chronic hepatitis. Results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology, of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases and of Compensated Hepatitis (HepNet)]. *Pathologe,* 25(5): p. *337-48*; 2004.

89. Schreiner, E. and M. Höhne, Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. *www.hepatitis-c.de*; 2001.

90. Schuppan, D., Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis,* 10(1): p. *1-10*; 1990.

91. Schwartz, M.W., D.G. Baskin, K.J. Kaiyala, and S.C. Woods, Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr,* 69(4): p. *584-96*; 1999.

92. Seufert, J., Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes,* 53 Suppl 1: p. *S152-8*; 2004.

93. Silver, K., J. Walston, W.K. Chung, F. Yao, V.V. Parikh, R. Andersen, L.J. Cheskin, D. Elahi, D. Muller, R.L. Leibel, and A.R. Shuldiner, The Gln223Arg and Lys656Asn polymorphisms in the human leptin receptor do not associate with traits related to obesity. *Diabetes,* 46(11): p. *1898-900*; 1997.

94. Simmonds, P., E.C. Holmes, T.A. Cha, S.W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P.L. Yap, J. Kolberg, and M.S. Urdea, Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol,* 74 (Pt 11): p. *2391-9*; 1993.

95. Simmonds, P., F. McOmish, P.L. Yap, S.W. Chan, C.K. Lin, G. Dusheiko, A.A. Saeed, and E.C. Holmes, Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol,* 74 (Pt 4): p. *661-8*; 1993.

96. Simmonds, P., K.A. Rose, S. Graham, S.W. Chan, F. McOmish, B.C. Dow, E.A. Follett, P.L. Yap, and H. Marsden, Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol,* 31(6): p. *1493-503*; 1993.

97. Snoussi, K., A.D. Strosberg, N. Bouaouina, S. Ben Ahmed, A.N. Helal, and L. Chouchane, Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer,* 6: p. *38*; 2006.

98. Stefan, N., B. Vozarova, A. Del Parigi, V. Ossowski, D.B. Thompson, R.L. Hanson, E. Ravussin, and P.A. Tataranni, The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 26(12): p. *1629-32*; 2002.

99. Stickel, F. and C.H. Osterreicher, The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol,* 41(3): p. *209-24*; 2006.

100. Sweeney, G., Leptin signalling. *Cell Signal,* 14(8): p. *655-63*; 2002.

101. Takahashi, Y., Y. Okimura, I. Mizuno, K. Iida, T. Takahashi, H. Kaji, H. Abe, and K. Chihara, Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem,* 272(20): p. *12897-900*; 1997.

102. Thompson, D.B., E. Ravussin, P.H. Bennett, and C. Bogardus, Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet,* 6(5): p. *675-9*; 1997.

103. van Rossum, C.T., B. Hoebee, J.C. Seidell, C. Bouchard, M.A. van Baak, C.P. de Groot, M. Chagnon, C. de Graaf, and W.H. Saris, Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 26(4): p. *517-28*; 2002.

104. Wauters, M., R.V. Considine, and L.F. Van Gaal, Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol,* 143(3): p. *293-311*; 2000.

105. Wauters, M., I. Mertens, M. Chagnon, T. Rankinen, R.V. Considine, Y.C. Chagnon, L.F. Van Gaal, and C. Bouchard, Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord,* 25(5): p. *714-20*; 2001.

106. Wejstal, R., Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol,* 31 Suppl 1: p. *92-5*; 1999.

107. Willett, E., Non-Hodgkin´s lymphoma, obesity and energy homeostasis polymorphisms. *Britisch Journal of Cancer,* 93: p. *811-816*; 2005.

108. Woo, H.Y., H. Park, C.S. Ki, Y.L. Park, and W.G. Bae, Relationships among serum leptin, leptin receptor gene polymorphisms, and breast cancer in Korea. *Cancer Lett,* 237(1): p. *137-42*; 2006.

109. Yano, M., H. Kumada, M. Kage, K. Ikeda, K. Shimamatsu, O. Inoue, E. Hashimoto, J.H. Lefkowitch, J. Ludwig, and K. Okuda, The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology,* 23(6): p. *1334-40*; 1996.

110. Yiannakouris, N., M. Yannakoulia, L. Melistas, J.L. Chan, D. Klimis-Zacas, and C.S. Mantzoros, The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab,* 86(9): p. *4434-9*; 2001.

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Form von Postern oder Kurzfassungen (Abstracts) im Rahmen der Jahrestagung der DGP in Hannover (2007) und der GASL-Konferenz in Göttingen (2007) veröffentlicht.

Die Kurzfassungen wurden veröffentlicht unter:

1. Drebber U, Sandelin B, Wedemeyer I, Kuehnen E, Rey J, Weiskirchen R, Scheffler M, Odenthal M, Dienes H P:
   Auftreten der Gln223Arg-Mutation im Gen des Leptinrezeptors und der Pro-12Ala-Mutation im Gen des PPARγ bei Patienten mit chronischer Hepatitis C.
   Z Gastroenterol 2007; 45

2. Rey J, Sandelin B, Scheffler M, Kasper H U, Gerken G, Canbay A, Dienes H P, Odenthal M:
   Incidence of genetic polymorphisms of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ and leptin receptor gene in patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.
   Z Gastroenterol 2007; 45

3. Rey J, Sandelin B, Scheffler M, Kasper H U, Gerken G, Canbay A, Dienes H P, Odenthal M:
   Genetic polymorphisms of the ppar g and leptin receptor gene in patients with non-alcoholic fatty liver disease
   PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 203 (5): 379-379 342 2007

9 LEBENSLAUF

Name	Björn Benedikt Sandelin
Geburtsdatum	13.11.1971
Geburtsort	Pargas, Finnland
Nationalität	finnisch
Eltern	Björn Odo Rafael Sandelin, Dipl.-Chemiker Gunilla Beata Sandelin, geb. Brenner, Dipl.-Psychologin
1. Schulausbildung	1979-1988 Sarlinska Skolan, Pargas, Finnland
1. Ausbildung	1988-1991 Ausbildung zum Koch, Pargas und Mariehamn/Finnland
Berufliche Tätigkeit	1991-1992 Koch im Restaurant Pikku Varpunen, Kaarina/Finnland
2. Ausbildung	1993-1994 Ausbildung zum Krankenpflegehelfer, Copenhagen
Berufliche Tätigkeit	1994-1995 Krankenpflegehelfer im Peter-Lykke-Pflegeheim, Copenhagen
2.Schulausbildung	1995-1999 Vesterbro-Gymnasium, Copenhagen
Schulabschluss	Abitur im Juni 1999 am Vesterbro Gymnasium
Studium	Okt.2000 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Köln April 2003 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung Nov. 2007 Ablegen der Ärztlichen Prüfung
Nebentätigkeiten	Aushilfe in Praxis für Dermatologie 2004-2006
Praktisches Jahr	Dermatologie, Uniklinik Köln, Hs. 15 Innere Medizin, Uniklinik Köln, Hs. 16 Chirurgie, Uniklinik Köln
Doktorarbeit	Jan. 2007 bis Febr. 2008 bei Universitätsprofessor H. P. Dienes, Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln, unter Anleitung von Fr. Dr. rer. nat. M. Odenthal

Köln, den 10. August 2008 Benedikt Sandelin