

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
Direktor: Professor Dr. med. Frank Lammert

Sequenzvariation des Glutaminase-Gens als Risikofaktor für die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie bei Leberzirrhose

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von: Lara Barbara Mayer
geboren: am 03.05.1988 in Stuttgart

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichtersteller:

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	5
2.1 Hepatische Enzephalopathie	5
2.2 Rolle der Glutaminase	8
2.3 Zielsetzungen	10
3. Untersuchungsgut und Methodik	11
3.1 Studiendesign.....	11
3.2 Flimmerfrequenzanalyse	11
3.3 Molekulargenetische Methoden.....	13
3.3.1 Isolierung von DNA aus EDTA-Blut.....	13
3.3.2 Ermittlung der DNA-Quantität.....	14
3.3.3 PCR-Amplifikation von DNA.....	14
3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	16
3.3.4.1 Herstellung des Agarose-Gels.....	17
3.3.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese	17
3.3.5 Visualisierung der PCR-Banden.....	17
3.3.6 Genetische Analyse des Mikrosatelliten mit Hilfe des Sequenzierers ...	18
3.3.6.1 PCR für die Kapillar-Elektrophorese.....	18
3.3.6.2 Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Reaktion	18
3.3.6.3 Aufreinigung	19
3.3.6.4 Mikrosatellitenanalyse mittels Kapillarsequenzierer	19
3.4 Materialien	20
3.5 Statistische Analysen	23
4. Resultate.....	24
4.1 Patientencharakteristika	24
4.1.1 Ätiologie der Leberzirrhose	25
4.1.2 Laborchemische Parameter	26

4.1.3 Klinische Angaben und Stadieneinteilung der Leberzirrhose	27
4.2 Phänotypisierung durch Flimmerfrequenzanalysen.....	28
4.3 Genotypisierung	29
4.4 Statistische Analysen von Geno- und Phänotypen.....	32
4.4.1 Prüfung der Genotypen auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	32
4.4.2 Korrelationen der Genotypen mit Phänotypen	34
4.4.2.1 Korrelationen der Genotypen mit den CFF-Mittelwerten	34
4.4.2.2 Korrelationen der Genotypen mit dem Vorliegen und dem Schweregrad der hepatischen Enzephalopathie	35
4.4.2.3 Korrelationen der Genotypen mit weiteren Komplikationen der Leberzirrhose.....	37
4.4.3 Korrelationen der laborchemischen Parameter	39
4.4.4 Zusammenhang von Alter und Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie	43
4.4.5 Verbindung zwischen Ätiologie der Leberzirrhose und Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie	44
4.4.6 Veränderte CFF-Werte nach Therapie der portalen Hypertension.....	45
4.4.7 Univariate Regressionsanalysen.....	46
4.4.8 Multiple Regressionsanalysen.....	47
5. Diskussion.....	49
6. Literaturverzeichnis	54
7. Anhang.....	60
7.1 Tabellenverzeichnis.....	60
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	61
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	62
8. Danksagung.....	63
9. Curriculum vitae	64

1. Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie gilt als eine komplexe neuropsychiatrische Komplikation der Leberzirrhose und ist mit einer erhöhten Mortalität der von ihr betroffenen Patienten verbunden. Mehrere Pathomechanismen werden mit dem Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie in Verbindung gebracht, insbesondere die Hyperammonämie oder Entzündungsprozesse. Welche Rolle die Bildung von Ammoniak durch die intestinale Glutamin-desaminierung spielt, war bisher unklar. 2009 wurde erstmals eine Assoziation zwischen einem Mikrosatelliten in der Promotorregion des Glutaminase-Gens und der Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie beschrieben. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die beschriebene Glutaminase-Variante einen genetischen Risikofaktor für die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie darstellt.

(1) Insgesamt wurden 158 Patienten mit Leberzirrhose auf DNA-Längenunterschiede im Promotorbereich des Glutaminase-Gens untersucht. Zur Quantifizierung der hepatischen Enzephalopathie und Phänotypisierung diente in der vorliegenden Studie die Flimmerfrequenzanalyse. Korrelationen zwischen laborchemischen Parametern oder klinischen Charakteristika und genetischen Einflussgrößen wurden ebenfalls geprüft.

(2) Die Genotypisierung wurde mit Hilfe von Gelelektrophorese und Kapillarsequenzierung durchgeführt. Die Verteilung der drei Genotypen heterozygot, homozygot „lang“ und homozygot „kurz“ zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

(3) In der weiteren Analyse konnte belegt werden, dass sich die Flimmerfrequenz-Mittelwerte der drei Genotypen signifikant unterschieden. Es gelang zu zeigen, dass Patienten mit der „langen“ Mikrosatelliten-Variante ein größeres Risiko für die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie hatten. Die Häufigkeiten der Genotypen bei Patienten ohne hepatische Enzephalopathie und bei Patienten mit pathologischen Flimmerfrequenz-Werten unterschieden sich signifikant voneinander. Das Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie war mit dem homozygot „langen“ Genotypen, dem Alter und der äthyltoxischen Genese der Leberzirrhose assoziiert. In der multiplen Regressionsanalyse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass

Glutaminase-Genotypen und Serumnatrium die Flimmerfrequenz-Werte unabhängig voneinander beeinflussten.

(4) Träger der genetischen Risikovariante entwickelten als weitere Komplikation der Leberzirrhose signifikant häufiger eine spontane bakterielle Peritonitis.

(5) Trotz Unterschiede in Material und Methodik in unserer und der spanischen Studie konnte die Assoziation des Glutaminase-Promotor-Polymorphismus mit der Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie repliziert werden.

(6) Bisher wurden weder für die Leberzirrhose noch für die Entwicklung der Zirrhose-Komplikationen systematisch potenzielle Risikogene untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten die intestinale Glutaminase als Risikogen. Die zusätzliche Assoziation mit der äthyltoxischen Genese der Leberzirrhose weist auf Gen-Umwelt-Interaktionen hin.

Summary

Hepatic encephalopathy is a complex neuropsychiatric complication of liver cirrhosis and impairs patients survival. Different pathophysiological factors contribute to the development of hepatic encephalopathy, in particular hyperammonemia and systemic inflammation. The role of ammonia production by intestinal glutamine deamidation has yet to be defined. In 2009 an association between a microsatellite in the promoter region of the intestinal glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy was first identified in a Spanish cohort. In our study we assessed whether the described glutaminase variant promotes the development of hepatic encephalopathy.

(1) We recruited 158 patients with liver cirrhosis and analysed sequence differences in the promoter of the glutaminase gene. Hepatic encephalopathy was quantified and phenotyped by critical flicker frequency. Correlations between blood parameters and clinical characteristics as well as genetic factors were also examined.

(2) The glutaminase variants were genotyped by PCR-based assays with 5' nuclease and fluorescence detection. The distributions of the genotypes heterozygous, homozygous 'long' and homozygous 'short' were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium.

(3) Critical flicker frequency values differed significantly between carriers of distinct glutaminase genotypes. Patients with the 'long' glutaminase variant were at higher risk to develop hepatic encephalopathy. Genotype distributions differed between patients with pathological critical flicker frequency values and patients without hepatic encephalopathy. The presence of hepatic encephalopathy was associated with the 'long' glutaminase variant, age and liver cirrhosis due to alcoholic liver disease. Multiple analysis demonstrated critical flicker frequency values to be independently influenced by the glutaminase variant and serum sodium concentration.

(4) The frequency of spontaneous bacterial peritonitis, another complication of liver cirrhosis, was increased in carriers of the glutaminase risk variant.

(5) In spite of different materials and methods in our study and the Spanish study, the association of the glutaminase promoter polymorphism and the occurrence of hepatic encephalopathy could be replicated.

(6) Few studies have evaluated the association between genetic variants and complications of liver cirrhosis. The results of this study support intestinal glutaminase as a risk gene for hepatic encephalopathy. Our findings indicate that the alcoholic etiology of liver cirrhosis could aggravate the effect of the genetic risk variant on the development of hepatic encephalopathy. This observation provides evidence for a potential gene × environment interaction.

2. Einleitung

2.1 Hepatische Enzephalopathie

Zu den häufigsten Ätiologien der Leberzirrhose in der westlichen Welt zählen alkoholische Lebererkrankungen und die chronische Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion, wohingegen die Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion in den meisten Teilen Asiens und Afrikas die Genese bestimmt ⁴⁶. Weitere Ursachen sind die nichtalkoholische Steatohepatitis, Autoimmunhepatitis, primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis oder Stoffwechselkrankheiten wie Hämochromatose und Morbus Wilson.

Bei 30 - 45% der Patienten mit Zirrhose ^{4, 42} und 10 - 50% der Patienten mit transjugulären intrahepatischen portosystemischen Stent-Shunts (TIPS) ^{10, 33, 36} entwickelt sich eine hepatische Enzephalopathie (HE). Die Zahl der Patienten, bei denen erstmals eine HE diagnostiziert wird, hat sich in den USA zwischen 1993 und 2003 mehr als verdoppelt ³⁸. Das jährliche Risiko eines Zirrhosepatienten, eine HE zu entwickeln, liegt zwischen 5 und 6% ⁵³. Neben Aszites und Varizenblutungen stellt die HE eine wichtige Komponente der hepatischen Dekompensation dar. Das mittlere Überleben von Patienten mit Zirrhose wird durch eine HE von über 8 Jahre auf etwa 2 Jahre gesenkt ¹⁶. Daher stellt die HE einen signifikanten Indikator für das Mortalitätsrisiko dar ¹⁷. Studien haben belegt, dass Patienten mit HE eine 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 43% und eine 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 23% haben ¹¹.

Die HE - auch portosystemische Enzephalopathie genannt - gilt als eine komplexe neuropsychiatrische Komplikation der Leberzirrhose. Es werden eine akut reversible von einer chronisch progredienten Form unterschieden. Mehrere Pathomechanismen werden mit dem Auftreten einer HE in Verbindung gebracht (Abb. 1). Historisch hat die Hyperammonämie Erklärungen zur Pathogenese dominiert. So fand man bereits Ende des 19. Jahrhunderts bei Hunden HE-ähnliche Symptome wie Verwirrung, Aggression und Irritiertheit, nachdem bei diesen portocavale Shunts angelegt worden waren ³². Etwa drei Jahrzehnte später wurde Ammoniak als Hauptgrund des „meat

intoxification syndrome“ bei portocaval geschunteten Hunden angesehen ²⁷. In den letzten Jahren rückten zunehmend andere Faktoren wie entzündliche Prozesse, Hyponatriämie, osmotischer und oxidativer Stress in den Fokus der Untersuchungen ^{34, 45, 49, 51}. Es wird heute allgemein angenommen, dass synergistische Effekte von Ammoniak-erhöhung und Entzündungsmechanismen ein Anschwellen von Astrozyten und Hirnödeme verursachen ³⁹. Astrozyten sind die einzigen Zellen im Gehirn, die Ammoniak mit Hilfe der Glutaminsynthetase zu Glutamin metabolisieren können ¹⁴. Durch die osmolytische Wirkung der Glutaminerhöhung schwellen die Astrozyten an. Zerebrales Ödem und intrakranielle Hypertension sind die Folgen. Die genauen molekularen Mechanismen der morphologischen Veränderungen im Gehirn konnten bislang aber nicht vollständig aufgeklärt werden.

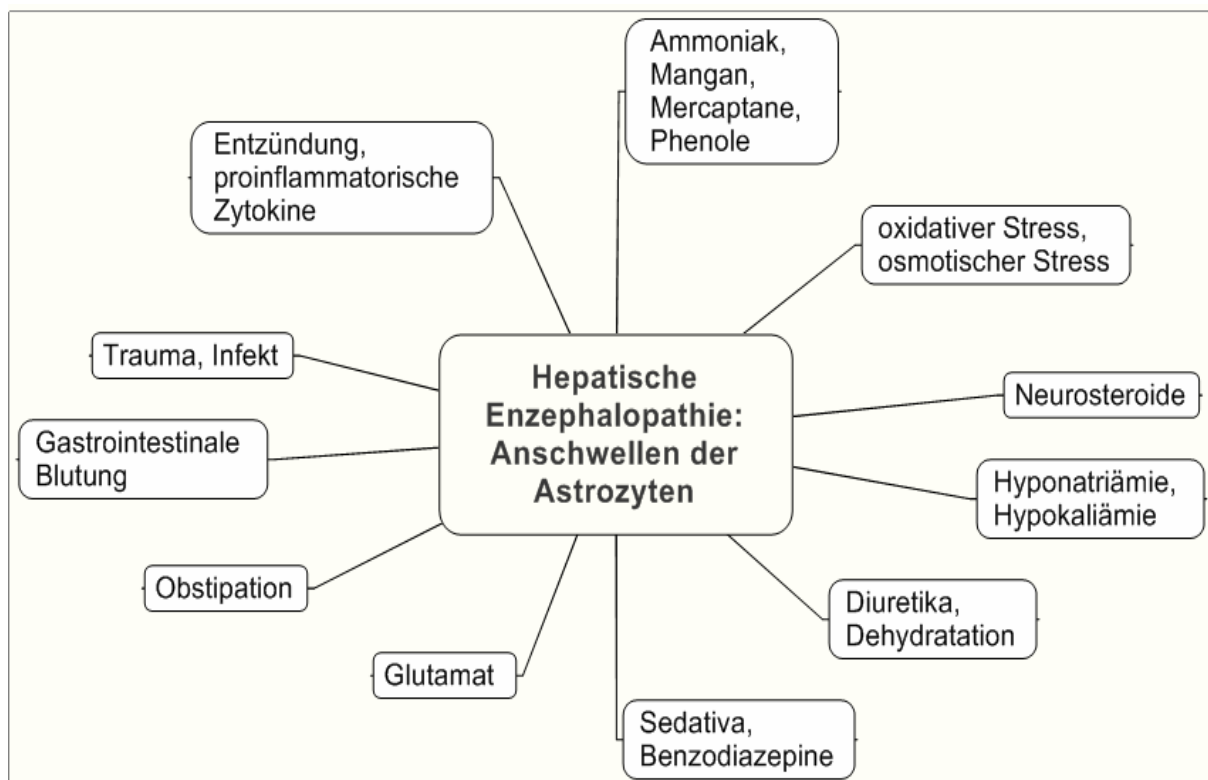


Abb. 1: Pathogenesemodell und auslösende Faktoren der HE, modifiziert nach Prakash et al. ³⁹

Klinisch zeigen sich bei der HE vielgestaltige Qualitätseinbußen hinsichtlich Bewusstseinslage, Intellekt und Verhalten sowie im neuromuskulären Bereich. Die Patienten leiden unter Schläfrigkeit, Verwirrung, verwaschener Sprache und Konzentrationsschwäche. Apathie, Flapping tremor (grob-schlägiges Zittern der Hände) und Foetor hepaticus (süßlicher, leicht fötider Geruch nach Aceton) sind ebenfalls feststellbar. Gemäß der West Haven-Klassifikation lässt sich der Schweregrad der HE folgendermaßen einteilen ¹⁹:

Grad 1	Euphorie oder Ängstlichkeit, leichte Aufmerksamkeits- und Bewusstseinsstörungen, beeinträchtigt Additionsvermögen
Grad 2	Lethargie oder Apathie, leichte Desorientiertheit bezüglich Zeit und Ort, Persönlichkeitsveränderungen, unangemessenes Verhalten, beeinträchtigt Subtraktionsvermögen
Grad 3	Somnolenz bis Semistupor, Antwort auf verbale Stimuli, Verwirrung, Desorientiertheit
Grad 4	Koma (keine Antwort auf verbale oder schmerzhafte Reize)

Tab. 1: Klinische Einteilung der HE

Grad 0 entspricht der so genannten minimalen oder latenten HE, welche bei bis zu 60% aller Leberzirrhotiker entdeckt wurde ¹. Sie führt in etwa der Hälfte der Fälle zu Symptomen ²¹ und ist nur durch spezifische neuropsychiatrische oder neurophysiologische Tests detektierbar. Die minimale HE ist mit einer reduzierten Lebensqualität assoziiert, z.B. durch das eingeschränkte Vermögen, ein Fahrzeug zu führen oder eine Maschine zu bedienen ⁵⁶.

Voraussetzungen für die Diagnose der HE sind der Nachweis einer Lebererkrankung und einer Funktionsstörung im zentralen Nervensystem (ZNS) sowie der Ausschluss anderer Faktoren, die eine Enzephalopathie begünstigen könnten. Bisher gibt es keinen Laborparameter oder Goldstandard, der eine sichere Diagnose gewährleistet. Die Ammoniakkonzentration muss nicht zwangsläufig erhöht sein, eine symptomatische Besserung geht aber meistens mit einer Erniedrigung der Konzentration einher.

Eine evidenzbasierte Therapie für die minimale HE gibt es bisher nicht. Für Patienten mit manifester HE sind verschiedene Therapieoptionen verfügbar. Das Therapiekonzept umfasst neben der kausalen Therapie der Leberzirrhose (Alkoholverbot, Viruselimination) die symptomatische Behandlung. Hierunter fallen die Beseitigung auslösender Faktoren wie z.B. gastrointestinale Blutung oder Infekt sowie das Absetzen von Diuretika und Sedativa. Mit Laktulose wird sowohl die Synthese als auch die Absorption von Ammoniak im Darm reduziert⁵⁴. Durch die Beseitigung ammoniakbildender Bakterien verhindert das nicht resorbierbare Antibiotikum Rifaximin das Auftreten einer erneuten HE-Episode⁷. Zur Therapie der HE ist Rifaximin in Deutschland allerdings bisher noch nicht zugelassen. Der Reduktion ZNS-toxischer Eiweißmetabolite des Darms dient die Gabe von L-Ornithin-L-Aspartat, welches den Harnstoffzyklus beschleunigt. Im Harnstoffzyklus wird dabei ein Ammoniumion entfernt, in dem es in eine Aminosäure eingebaut wird. Ebenso wird der Verzehr von verzweigtkettigen Aminosäuren empfohlen, um dem durch den Untergang der Hepatozyten entstandenen Ungleichgewicht von verzweigtkettigen und aromatischen Aminosäuren entgegenzuwirken. Hierfür konnte aber bisher noch kein eindeutiger klinischer Vorteil nachgewiesen werden³. Der Nutzen einer oralen Supplementation von Zink, welches für den Proteinmetabolismus und zahlreiche Zink-Metalloenzyme notwendig ist, konnte in Studien belegt werden²⁰. Patienten zeigten einen Abfall des Ammoniakspiegels im Blut und der HE-Grad besserte sich. Letztendlich besteht die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit in einer Lebertransplantation, welche im Jahr 2010 bei 1192 Patienten (http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2010.pdf) in Deutschland durchgeführt wurde.

2.2 Rolle der Glutaminase

Bei Patienten mit Leberzirrhose und HE zeigt sich häufig eine systemische Hyperammonämie. Wichtigste Transportform für Ammoniak im menschlichen Körper ist Glutamin. Die Hauptquelle des Ammoniaks scheint die Glutamindesaminierung zu sein³⁵. Katalysiert wird die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat und einem Ammoniumion unter Verwendung von Wasser von der Phosphat-aktivierten Glutaminase, welche auch als Glutaminase I bezeichnet wird (Abb. 2). Die

Glutaminase befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran und wird vom Glutaminase-Gen kodiert ³¹. Bisher konnten mehrere Isoformen der Glutaminase beschrieben werden. Sie entstehen gewebsabhängig durch alternatives Splicen. Eine Isoform kommt ausschließlich in der postnatalen Leber vor. Das entsprechende Gen dieser L-Typ-Glutaminase ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Die andere Isoform ist in Nieren, Gehirn und Enterozyten zu finden; ihre katalytische Aktivität wird durch Glutamat inhibiert ¹⁵ (Abb. 2). Das kodierende Glutaminase-Gen (*GLS*) liegt auf Chromosom 2.

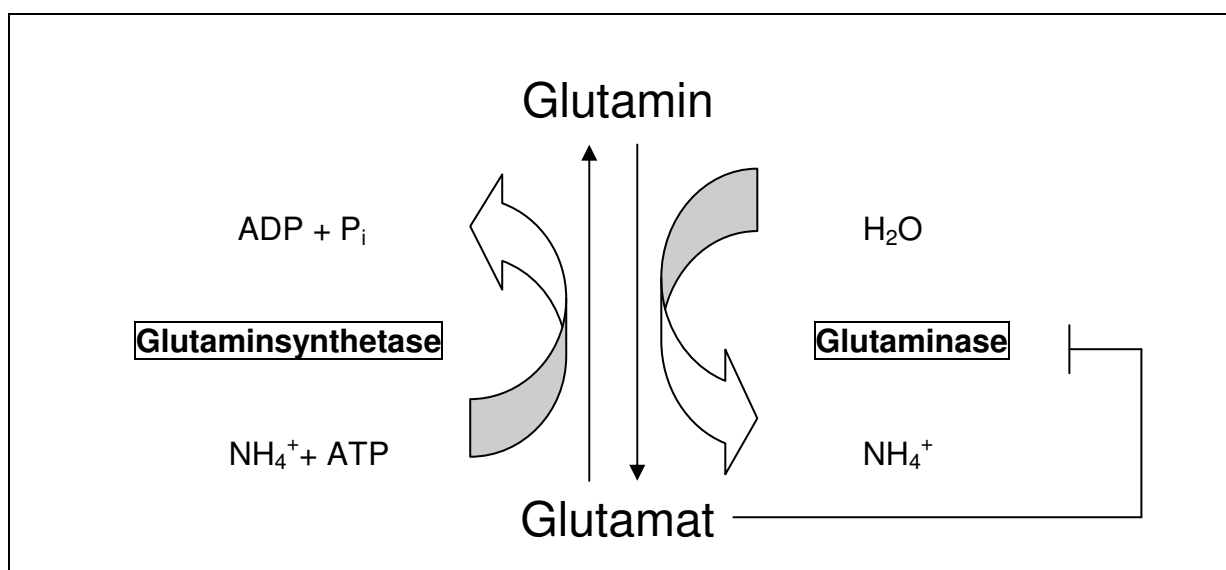


Abb. 2: Glutaminsynthese und -desaminierung mit Hilfe der Phosphat-aktivierten Glutaminase, die in Nieren, Gehirn und Enterozyten exprimiert wird.

Bei Gesunden findet sich die höchste Glutaminaseaktivität (85%) im Dünndarm, ein geringer Teil im Dickdarm ²². Patienten mit Zirrhose weisen im Vergleich zu Gesunden eine viermal höhere Glutaminaseaktivität in Darm und Nieren auf ⁴⁴. Welcher Mechanismus für diese Aktivitätserhöhung genau verantwortlich ist, konnte bislang nicht geklärt werden.

Hyperammonämie und HE scheinen aber auch ohne Beteiligung von Darmbakterien auftreten zu können. Bei Tests mit Hunden wurden die Ammoniakkonzentrationen nach einer Blut-Mahlzeit mit und ohne Darmdekontamination untersucht. Die Kurven der raschen Ammoniak-Anflutung waren in beiden Fällen gleich ⁵⁵. Daraus lässt sich ableiten, dass es zusätzlich einen genetischen Faktor geben könnte, der die

Konversionsrate von Glutamin zu Ammoniak in peripheren Geweben und Gehirn bedingt. 2009 wurde in einer spanischen Studie von einem Mikrosatelliten in der *GLS*-Promotorregion auf Chromosom 2 berichtet, der das Risiko für eine manifeste HE von 19% auf 40% erhöhte ⁴³. Funktionelle Tests zeigten in vitro eine erhöhte Transkriptionsrate. Die Beobachtungen deuten auf eine gesteigerte Expression der Glutaminase hin, wodurch Glutamindegradation und Ammoniakproduktion verstärkt werden. Darüber hinaus könnte die Induktion der Glutaminase eine direkte Rolle in der Pathogenese der HE im Gehirn spielen. Akkumuliertes Glutamin gelangt in die Mitochondrien der Astrozyten, wo es zu Glutamat und Ammoniak umgewandelt wird, sodass in der Folge die Astrozyten anschwellen.

2.3 Zielsetzungen

Die HE ist das Resultat eines komplexen Interaktionsprozesses verschiedener Mechanismen. Das Ziel der Arbeit ist es, ein Patientenkollektiv auf *GLS*-Varianten, die zur Entwicklung einer HE prädisponieren und deren Schweregrad beeinflussen können, zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Leberzirrhose bezüglich Mikrosatelliten im Promotorbereich des *GLS*-Gens analysiert und der Frage nachgegangen, ob genetische Varianten für eine HE prädisponieren. Anhand der Erfassung laborchemischer Parameter sollte weiterhin festgestellt werden, welche Werte für die Diagnosestellung einer HE und die Verlaufsbeurteilung nützlich sein können. Außerdem sollten mögliche Korrelationen zwischen den verschiedenen Laborwerten sowie zwischen klinischen Charakteristika und genetischen Einflussgrößen erarbeitet werden.

3. Untersuchungsgut und Methodik

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Beobachtungsstudie zur Ursachenforschung der HE. Einschlusskriterium für die Population dieser Studie war die Diagnose einer Leberzirrhose. Diagnostisch gesichert und im Verlauf beurteilt wurde das Krankheitsbild anhand der klinischen, laborchemischen, sonographischen und histologischen Befunde in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes. Merkmale wie Alter, Geschlecht, Ätiologie der Lebererkrankung, laborchemische Parameter und weitere Komplikationen wie die spontane bakterielle Peritonitis (SBP) der Leberzirrhose wurden ebenfalls erfasst.

Voraussetzung war die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten zur Verwendung ihrer Daten und Probenmaterialien zu Forschungszwecken gemäß der geltenden Richtlinien der Ethikkommission. Zur Durchführung der Studie lag ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes vor (Kennnummer 271/11).

3.2 Flimmerfrequenzanalyse

Möglichst noch am Tag der Blutentnahme wurde bei den Patienten eine Flimmerfrequenzanalyse mit Hilfe des HEPATonormTM-Analyzers durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein kleines tragbares Messgerät, in das der Patient hineinschaut. Das Auge der Testperson wird mit Licht schrittweise von 0,1 - 1,0 Hz/sec in absteigender Reihenfolge gereizt. Der Lichtreiz liegt im Bereich 25 - 60 Hz. Sobald der Patient einen Wechsel von Gleichlicht in Flimmern bemerkt, wird dies durch Drücken auf eine Fernbedienung als kritische Flimmerfrequenz (CFF) registriert. Das Prinzip des Tests basiert darauf, dass retinale Gliazellen ähnlichen Veränderungen wie zerebrale Gliazellen unterliegen und anschwellen. Mit zunehmendem Schweregrad der HE nimmt die Flimmerfrequenz signifikant ab (Abb. 3, Tab. 2)²³. Für die Auswertung wurde der Test zehnmal wiederholt und der Mittelwert benutzt.

Mit Hilfe von Ishihara-Farbtafeln wurde bei den Patienten eine Rot-Grün-Blindheit ausgeschlossen, nur Patienten mit adäquatem Sehvermögen wurden in die Studie aufgenommen.

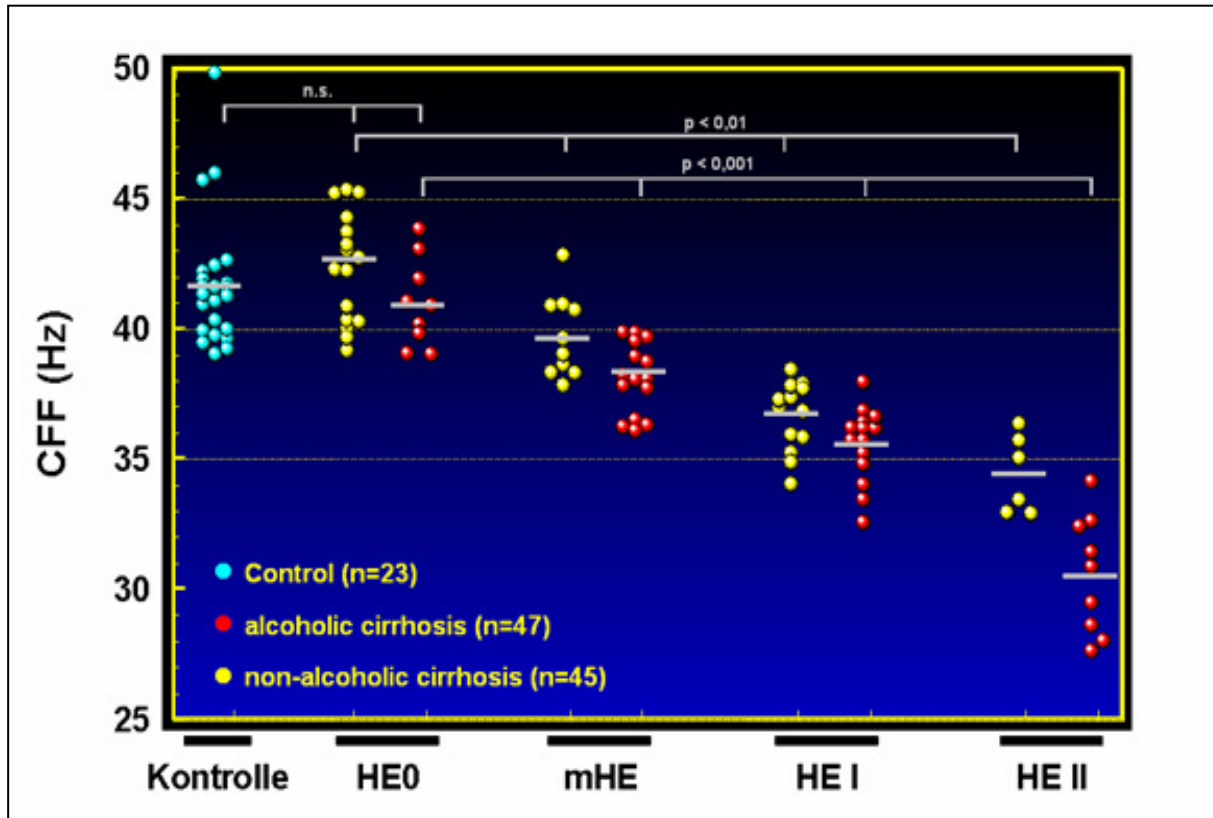


Abb. 3: Verlauf der Messwerte für die kritische Flimmerfrequenz in Abhängigkeit vom Schweregrad der HE, modifiziert aus Kircheis et al. ²³

Abkürzungen: HE 0 = Zirrhose ohne HE, mHE = minimale (subklinische) HE, HE I = HE 1. Grades, HE II = HE 2. Grades

> 39 Hz	kein Hinweis auf Enzephalopathie
38 - 39 Hz	Hinweis auf minimale (leichtgradige) HE
35 - 37,9 Hz	vereinbar mit HE ersten Grades
< 35 Hz	vereinbar mit HE mindestens zweiten Grades

Tab. 2: Einteilung der HE nach CFF-Ergebnissen

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 Isolierung von DNA aus EDTA-Blut

Den Studienteilnehmern wurden zwei EDTA-Blutproben abgenommen. In der Regel fand bereits nach wenigen Tagen Aufbewahrungszeit im Kühlschrank bei 4°C die DNA-Isolierung statt. Die DNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung eines Kits der Firma Qiagen nach folgendem Protokoll:

Schritte	Durchführung
Lyse	20 µl QIAGEN Protease in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben 200 µl Blut und 200 µl Puffer AL hinzufügen 15 sec mischen 10 min inkubieren bei 56°C kurzes Zentrifugieren 200 µl Alkohol (96 - 100%) hinzugeben 15 sec mischen
Bindung	Röhrcheninhalte in Trennsäulen überführen 1 min zentrifugieren (8000 U/min) Trennsäulen in neue 2 ml Reaktionsgefäße setzen Durchfluss eliminieren
Waschen 1	500 µl Puffer AW1 hinzufügen 1 min zentrifugieren (8000 U/min) Trennsäulen in neue 2 ml Reaktionsgefäße setzen Durchfluss entfernen
Waschen 2	500 µl Puffer AW2 hinzugeben 3 min zentrifugieren (13000 U/min) Trennsäulen in neue 2 ml Reaktionsgefäße setzen Durchfluss verwerfen 1 min zentrifugieren (13000 U/min)

Elution	Trennsäulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße setzen Durchfluss verwerfen 100 µl Puffer AE hinzufügen 1 min bei Raumtemperatur inkubieren 1 min zentrifugieren (8000 U/min)
---------	--

Tab. 3: Protokoll für die DNA-Isolierung

3.3.2 Ermittlung der DNA-Quantität

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm wurde die DNA-Konzentration gegen Aqua destillata gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Lösung. Der optimale Wert bei DNA sollte über 1,8 liegen.

3.3.3 PCR-Amplifikation von DNA

Die Polymerasekettenreaktion dient der enzymatischen Amplifikation eines durch Primer definierten DNA-Abschnittes. Benötigt werden zwei spezifische Primer, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, eine ausreichende Menge an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und eine spezielle hitzebeständige DNA-Polymerase. Diese Taq-Polymerase hat ein Wirkungsoptimum zwischen 70 - 80°C. Die PCR besteht aus 25 - 35 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation. In der Folge nimmt die Zahl des selektiv vermehrten DNA-Abschnitts exponentiell zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sequenzvariation der Glutaminase, welche die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und einem Ammoniumion katalysiert, untersucht. Aktiviert wird das Enzym von Phosphat, weshalb es auch als Phosphat-aktivierte Glutaminase bezeichnet wird. Des Weiteren wird es auch als Glutaminase I oder aufgrund seiner Lokalisation als mitochondriale Glutaminase bezeichnet. Durch

gewebsabhängiges Splicen entstehen zwei Hauptisoformen der Glutaminase. Der Nieren-Typ wird exprimiert in Nieren, Gehirn, Darm sowie in der fetalen Leber. Codiert wird der Nieren-Typ auf Chromosom 2 (*GLS*). Die zweite Isoform, die sogenannte L-Glutaminase, kommt ausschließlich in der postnatalen Leber vor. Das entsprechende Gen der L-Typ-Glutaminase ist auf Chromosom 12 lokalisiert.

Mit der PCR-Technik wurden in der vorliegenden Arbeit Mikrosatelliten des Nieren-Typs der Glutaminase amplifiziert. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze, nicht kodierende repetitive DNA-Sequenzen von zwei bis vier Nukleotiden. Das Wiederholen von Trinukleotidsequenzen bezeichnet man als „variable number tandem repeats“ (VNTR). Zur Wahl der geeigneten Primer wurde zuerst die Sequenz des *GLS*-Transkripts über die Software Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) bestimmt. Bei der Primerauswahl sind die DNA-Sequenzen von Bedeutung, die die hier zu untersuchende Trinukleotidwiederholung (GCA)_n flankieren (Abb. 4). Diese wurden mit Hilfe des Programms Primer3 InPut (<http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3/>) bestimmt. Um optimale PCR-Bedingungen zu garantieren, wurde dabei darauf geachtet, dass die Länge der Primer 20 Basenpaare beträgt und die Schmelztemperatur bei 65°C sowie der GC-Anteil des Primers bei 65% liegen (Abb. 5).

CTCCGCGCAC CCAGAGCCGA GAGAAATTTG ACTGCCCTAA TCGCCAATCA AAAGAGAGGT CGAGGATTTG AGCCAATCGC AGCGGGCGAA AGGGGCGGGC CGTCGGCGAG CGCTGAAGGT CTCTAGCCCT CCCCTGCGCT TTAGCCTCAG TGCGGAGCCT TAGGCGGAGC GAAGAGAACC GGTGCGGGCA ATCCTAGCGC <u>GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCA</u> N CCCGCATCCG CTGCGGGAGT CCGAGCCGGA ACCACACCCA AGTAGCTGCC CTTTCCTCTT CTGTCATCTC ACCGCCAC CACAGACCGC GTTCCCGAG GAAACCGGCC GCCCACGCC GGAGCATCCT CCCCTGTTGA GCGGGCGCTG ACGGACCCGG CGGCATGATG CGGCTGCGAG GCTCGGGGAT GCTGCGGGAC

Abb. 4: VNTR (GCA)_n (unterstrichen) und die flankierende Sequenz von *GLS*

Forward (F) Primer	5`-GCC TCA GTG CGG AGC CTT AG-3`
Reverse (R) Primer	5`-GGG CAG CTA CTT GGG TGT GG-3`

Abb. 5: Sequenzen der verwendeten Primer für den *GLS*-Mikrosatelliten-Nachweis

Zur weiteren Analyse der Mikrosatelliten-DNA wurde eine PCR durchgeführt, die in einem Volumen von 25,15 µl angesetzt wurde:

Reagenzien	Volumen [µl]
H ₂ O Merck	17,50
10x PCR-Puffer	2,50
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTPs 10 mM	0,50
Primer F <i>GLS</i> 10 µM	0,50
Primer R <i>GLS</i> 10 µM	0,50
Taq-Polymerase 4 U/µl	0,40
DNA	2,50
	25,15

Tab. 4: Übersicht des Pipettierschemas für die PCR

Die Denaturierung erfolgte bei 95°C während 5 min. Im Anschluss wurde der folgende PCR-Zyklus 38 mal durchlaufen: Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C für 1 min, Anlagerung der Primer bei 60°C 45 sec lang und Elongation 1 min lang bei 72°C. Die finale Polymerisation erfolgte über 7 min bei 72°C. Danach wurden die Proben bei 4°C gelagert.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden die Produkte der PCR durch Anlegen einer Spannung nach Größe und Ladung getrennt. Für eine möglichst genaue Darstellung der kleinen PCR-Fragmente und der geringen PCR-Fragmentlängenunterschiede wurde ein vierprozentiges Gel verwendet.

3.3.4.1 Herstellung des Agarose-Gels

Für die Herstellung des vierprozentigen Agarose-Gels wurden 14 g der 3:1 Agarose in 350 ml auf 4°C vorgekühltem 1x TEA-Puffer mit Hilfe eines Magnetrührers untergemischt. Nach 15 min Ruhezeit wurde das Gemisch 2 min in der Mikrowelle bei mittlerer Hitze und danach mindestens 1 min auf höchster Stufe erhitzt, bis schließlich alle Partikel gelöst waren. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 17,5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml TAE-Puffer) zugegeben und das Gel gegossen.

3.3.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Für die anschließende Detektion der Amplifikationsprodukte (5 - 102 ng/µl) wurde den Proben je 1/10 des Volumenanteils Ladepuffer hinzugefügt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Für die Herstellung des Molekulargewichtsmarkers wurden 20 µl DNA-Molekular-Gewichtsmarker, 10 µl 6x Ladepuffer und 30 µl Wasser benötigt. In die Geltaschen wurden je 14 µl PCR-Produkt sowie 3 µl Molekulargewichtsmarker pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V über 90 - 120 min.

3.3.5 Visualisierung der PCR-Banden

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese wurden mit Hilfe eines digitalen Bilddokumentationssystems nach 90 min und nach weiteren 30 min dokumentiert. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid wirkt als Interkalator, der nach Bindung an DNA unter UV-Licht eine starke Fluoreszenz zeigt, während er in wässriger Lösung kaum fluoresziert. Die Belichtungszeit betrug 70 - 80 sec.

3.3.6 Genetische Analyse des Mikrosatelliten mit Hilfe des Sequenzierers

3.3.6.1 PCR für die Kapillar-Elektrophorese

Die folgenden Angaben gelten für 25 µl Ansätze. Folgende Lösungen werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

Reagenzien	Volumen [µl]
H ₂ O Merck	17,50
10x PCR Puffer	2,50
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTPs 10 mM	0,50
Primer F <i>GLS</i> FAM 10 µM	0,50
Primer R <i>GLS</i> 10 µM	0,50
Taq-Polymerase 4 U/µl	0,25
DNA	2,50
	25,00

Tab. 5: Übersicht des Pipettierschemas für die Sequenzierungs-PCR

Das PCR-Programm war identisch zu dem unter Punkt 3.3.3 genannten Schema. Der Primer wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) markiert, um die spätere Identifikation der DNA-Stücke im Acrylamid-Gel durch den Laser zu erleichtern.

3.3.6.2 Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Reaktion

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion folgte eine Gelelektrophorese mit zweiprozentiger Agarose. Dazu wurden 6 g Agarose mit 300 ml 1x TAE-Puffer gemischt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis eine schlierenfreie Lösung entstand. Nach Abkühlen wurden der Lösung 15 µl Ethidiumbromid beigefügt. Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer und Molekulargewichtsmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit

von 1,5 Stunden bei 100 V wurde das Ergebnis mit dem Fluor S Multiimager fotografiert. Bei erfolgreicher Durchführung der PCR schloss sich die Aufreinigung an.

3.3.6.3 Aufreinigung

Aufgereinigt wurde mit Hilfe eines Kits gemäß Herstellerprotokoll:

Schritt	Durchführung
DNA-Bindung	1 Volumenanteil des PCR-Produkts mit zwei Volumenanteilen des Puffer NT mischen NucleoSpin® Extract II Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß platzieren und mit den Proben beladen 1 min zentrifugieren (11000 x g)
Waschen	700 µl Puffer NT3 hinzufügen 1 min zentrifugieren (11000 x g) Durchfluss verwerfen und Säulchen in gleiches Gefäß setzen
Trocknen	2 min zentrifugieren (11000 x g)
Elution	Säulchen in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß setzen 30 µl Puffer NE dazugeben 1 min inkubieren bei Raumtemperatur 1 min zentrifugieren (11000 x g)

Tab. 6: Protokoll für die DNA-Aufreinigung

3.3.6.4 Mikrosatellitenanalyse mittels Kapillarsequenzierer

Von jeder Probe wurden 2 µl DNA (2 - 158 ng/µl) mit 12 µl Hi-Di™ Formamide und 0,3 µl Rox™ Größenstandard für die anschließende kapillarelektrophoretische Auftrennung aufbereitet. Der Laser detektierte die entsprechenden Farben. Über die Auswertungssoftware kann die Größe des PCR-Produkts bestimmt werden. Für die Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde die Software GeneMapper benutzt. Vor

der Anwendung musste eine Matrix mit dem Größenstandard durchgeführt werden. Als Laufeinstellungen wurden eine Injektionszeit von 7 sec und eine Laufzeit auf 60 min bei einer Temperatur von 60 °C festgesetzt.

3.4 Materialien

Allgemeine Chemikalien

Ethanol absolut	Merck
Steriles Wasser	Braun
Low TE Puffer	Merck
1 mM Tris-HCl, pH 7,6,	
0,001 mM EDTA	
50x TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer:	Merck
242 g/l Tris, 57 ml/l Eisessig,	
18,6 g/l Tritriplex III (EDTA)	

Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Pipetten 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
PCR-Reaktionsgefäße	Axygen (Nerbe Plus)
Filterspitzen	Sarstedt
Nitril-Handschuhe	Nobaglove
Trennsäulen	Qiagen
NucleoSpin® Extract II Säulen	MACHERY-NAGEL

Verwendete Kits

QIAamp Mini Kit and DNA Blood Mini Kit	Qiagen
NucleoSpin® Extrakt II	MACHERY-NAGEL

DNA-Isolierung

QIAGEN Protease

Puffer AL

Puffer AW1

Puffer AW2

Puffer AE



enthalten im QIAamp Mini Kit
und DNA Blood Mini Kit von Qiagen

PCR

10x PCR Puffer

Magnesiumchlorid (25 mM)

dTNP 10 mM

Taq-Polymerase (4 U/μl)

Primer

Primer FAM markiert (1:10 mit Low TE)

Invitrogen

Invitrogen

Fermentas

Invitrogen

Thermo Fisher Scientific GmbH

Thermo Fisher Scientific GmbH

Gelelektrophorese

Biozym Sieve 3:1 Agarose

Biozym Agarose

1x TAE-Puffer:

50x TAE-Puffer mit
destilliertem Wasser

Ladepuffer:

50 ml 50x TAE,
20 ml H₂O,
20 ml Glycerin,
Xylencyenol

Ultra low range DNA ladder

6x Ladepuffer

Ethidiumbromid Stammlösung

Biozym Scientific GmbH

Biozym Scientific GmbH

Merck

Merck

Fermentas

Fermentas

Merck

DNA-Aufreinigung

Puffer NT

Puffer NT3

Puffer NE

} enthalten im PCR clean up-Kit von
MACHERY-NAGEL

DNA-Sequenzierung

Hi-Di™ Formamide

Fluorescent Amidite Matrix Standard

Gene Scan™ 500 Rox™ Size Standard

Genetic Analyzer 10x Laufpuffer mit
EDTA

} Applied Biosystems

} Merck

Geräte

ABI PRISM DNA Sequencer

Applied Biosystems

Analysewaage

Sartorius

Fluor S Multiimager

Bio-Rad

Gelelektrophorese-Apparatur

Owl

Heizblock mit Magnetrührer

Heidolph

Mikrowelle

Panasonic

PCR workstation

air clean system

PCR-Gerät

Biometra

Spektralphotometer Nanodrop

Peqlab

Thermomixer comfort

Eppendorf

Vortex

Heidolph

Zentrifuge

Eppendorf

3.5 Statistische Analysen

Die laborchemischen und klinischen Daten der Studienkohorte wurden mit Hilfe des Programms SPSS Version 19 (IBM) auf Korrelationen geprüft. Korrelationen auf einem Niveau von $p < 0,05$ wurden dabei als signifikant bezeichnet und in Schaubildern mit dem Symbol * gekennzeichnet. Diagramme wurden mittels SPSS und Excel erstellt. Die Prüfung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit einem exakten Test und die Erstellung des De Finetti-Diagramms erfolgte mit Hilfe eines Software-Pakets des Helmholtz-Zentrums in München (<http://www.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>). Das Programm FBSTHW (Full Bayesian Significance Test for the Hardy-Weinberg equilibrium law) wurde benutzt, um eine multiallelische Signifikanzanalyse durchzuführen (<http://www.each.usp.br/laureto/programs.html>).

4. Resultate

4.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 158 Patienten mit Leberzirrhose in die Studie eingeschlossen. Die Altersverteilung der Kohorte entsprach der Normalverteilung. Das Alter der Patienten im Gesamtkollektiv lag zwischen 23 und 86 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter 59 ± 12 Jahre betrug (Abb. 6). Das Patientengut bestand aus 54 (34%) Frauen und 104 (66%) Männern. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 24 und 84 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 59 Jahren. Die männlichen Studienteilnehmer waren im Durchschnitt 59 Jahre alt, die Altersspannweite erstreckte sich von 23 bis 86 Jahren. Ausgehend von der Datenerfassung zum Studienzeitpunkt verstarben 6 Patienten (3,8%) im Laufe des Krankenhausaufenthaltes.

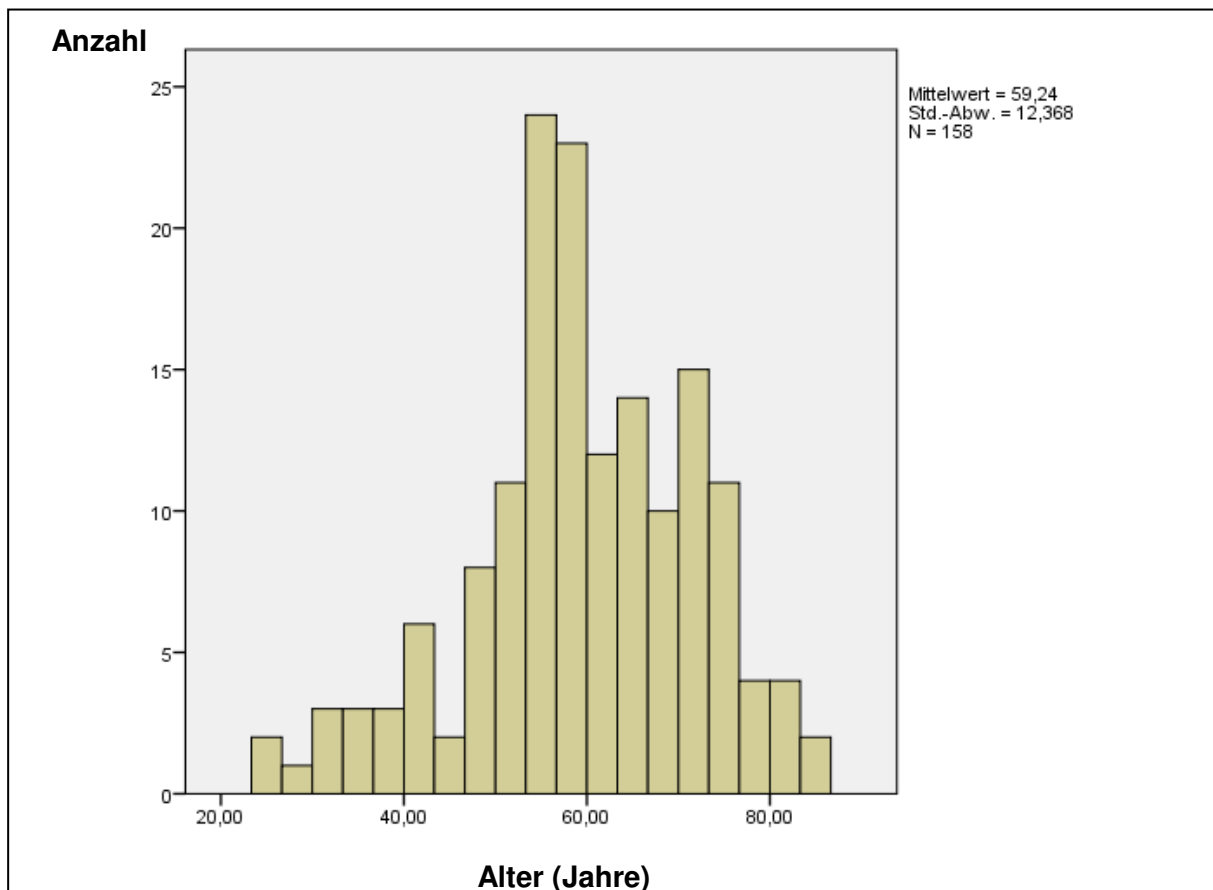


Abb. 6: Altersverteilung der Kohorte nach Patientenanzahl

4.1.1 Ätiologie der Leberzirrhose

59% (N = 93) der Patienten wiesen eine Leberzirrhose äthyltoxischer Genese auf. Als zweithäufigste Ursache für die Zirrhose in der Kohorte konnten die Hepatitisviren B, C oder D eruiert werden (Abb. 7). Insgesamt litten 24 Patienten (15%) an einer chronischen Hepatitis C Virus-Infektion. Bei fünf Personen (3%) konnte eine chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus und bei einem Patienten eine Koinfektion mit dem Hepatitis D Virus nachgewiesen werden. In 12 Fällen (8%) wurde eine kryptogene Leberzirrhose festgestellt. Bei sieben Personen (4%) war die Lebererkrankung multifaktoriell (viral und äthyltoxisch) bedingt. Eine autoimmune Genese wurde bei vier (2,5%) Patienten detektiert. Als weitere Ursachen für die Leberzirrhosen fanden sich nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) (N = 3), primär biliäre Zirrhose (PBC) (N = 2) und Hämochromatose (N = 2). Eine medikamentös-toxische Genese, α_1 -Antitrypsin-Mangel, Cystische Fibrose, Caroli-Syndrom und Budd-Chiari-Syndrom waren bei jeweils einem Patienten ursächlich für die Leberzirrhose.

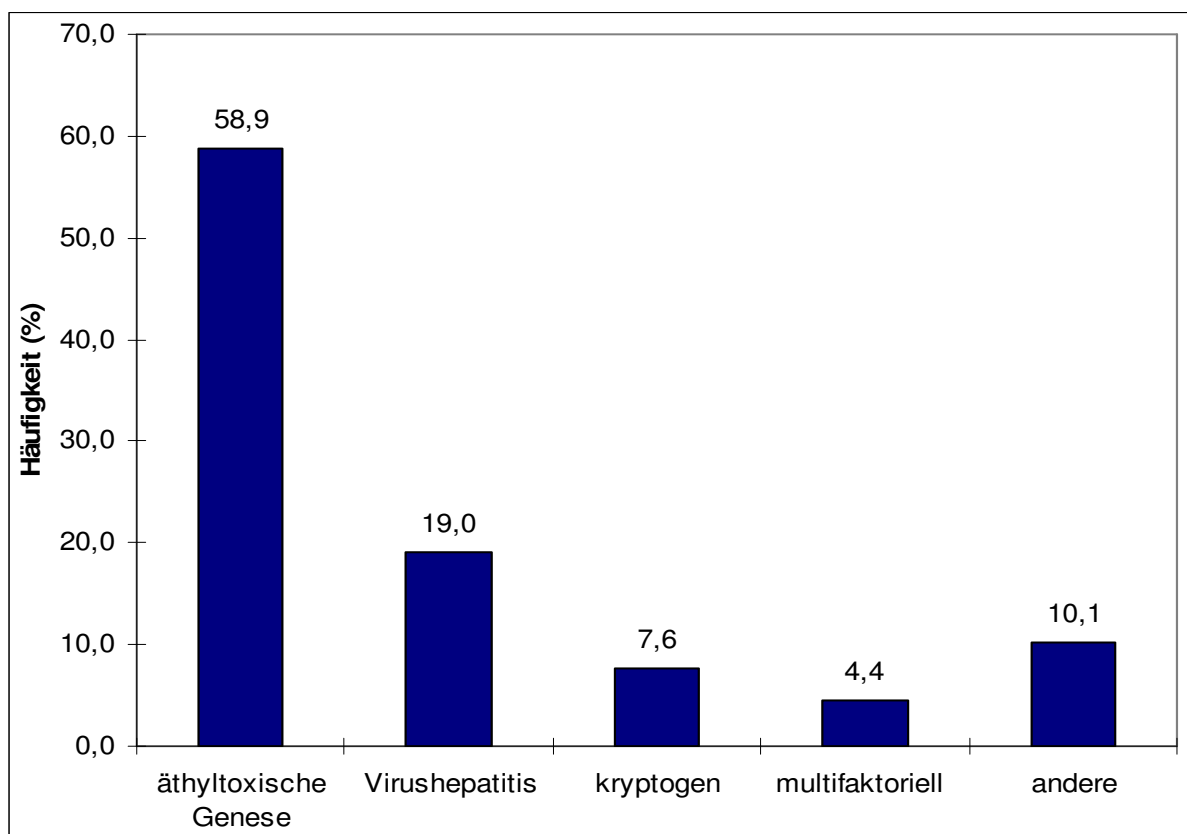


Abb. 7: Ätiologie der Leberzirrhose

4.1.2 Laborchemische Parameter

Die Bestimmung der laborchemischen Parameter und die Dokumentation der im Folgenden genannten klinischen Angaben der Studienpopulation erfolgten möglichst zeitnah zur Flimmerfrequenzanalyse. Zur Diagnose und Beurteilung der Schwere der Leberzirrhose dienten die Bestimmung von Quick-Wert beziehungsweise INR (international normalized ratio), Albumin, Bilirubin und Ammoniak. Für eine verminderte Syntheseleistung der Leber sprechen ein erniedrigter Quick-Wert bzw. eine erhöhte INR, ein erniedrigtes Albumin und ein erhöhtes Bilirubin im Serum. Bei der HE kann häufig eine erhöhte Ammoniakkonzentration gemessen werden. Tabelle 7 fasst die in dieser Studie erhobenen laborchemischen Parameter zusammen.

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard-abweichung	Normwert
Bilirubin (mg/dl)	3,9	0,2	38,7	6,6	< 1,2
Albumin (g/dl)	35	16	50	7	35 - 52
Ammoniak (µg/dl)	82	14	237	45	25 - 94
Kreatinin	1,2	0,5	3,1	0,5	0,5 - 0,9
Natrium (mmol/l)	137	120	148	5	135 - 145
Quick (%)	68	17	100	23	70 - 130
INR	1,30	1,00	3,00	0,40	0,85 - 1,15

Tab. 7: Laborchemische Daten der Zirrhosepatienten

Die mittlere Bilirubinkonzentration lag mit 3,9 mg/dl über der Norm. Insgesamt wiesen 61% der Patienten (N = 95) eine Hyperbilirubinämie auf. Die Hälfte (N = 77) der angegebenen Albuminwerte befand sich unterhalb des Normwertintervalls 35 - 52 mg/dl. Im Patientenkollektiv wurden Ammoniakkonzentrationen zwischen 14 und 237 µl/dl gemessen. Bei 36% (N = 48) der Personen lag eine Hyperammonämie vor. 52% (N = 80) der Kreatininwerte lagen im erhöhten Bereich. Die mittlere Natriumkonzentration lag bei 137 mmol/l. 45 Patienten (30%) der Kohorte zeigten eine Hyponatriämie. Bei mehr als der Hälfte der Patienten wurde ein verminderter

Quick-Wert gemessen. Der Quick-Wert lag im Mittel bei 68%, die INR war dementsprechend im Durchschnitt leicht erhöht.

4.1.3 Klinische Angaben und Stadieneinteilung der Leberzirrhose

Mit Hilfe der Kriterien Serumalbumin, Serumbilirubin, Quick-Wert, Aszites und Enzephalopathie-Schweregrad erfolgt die Klassifikation einer Zirrhose nach Child und Pugh^{40, 13}. Der Mittelwert der Child-Pugh-Punkte im Kollektiv betrug $7,3 \pm 1,9$ mit einem Minimum von 5 und einem Maximum von 12 Punkten. Nach Punkteaddition lassen sich drei Schweregrade unterscheiden. Bei 60 Personen (38,7%) des Patientenkollektivs lag das Stadium Child A (5 - 6 Punkte) vor, welches die beste Prognose hat. 46,5% der Kohorte (N = 72) wiesen Stadium Child B (7 - 9 Punkte) und 14,8% (N = 23) Stadium Child C (≥ 10 Punkte) auf.

Der MELD-Score (Model for end-stage liver disease) wird alternativ verwendet, um die 3-Monats-Mortalität bei einer fortgeschrittenen chronischen Lebererkrankung zu berechnen⁵⁷. Kreatinin, Bilirubin und INR werden zur Berechnung verwendet. Die entsprechende Formel lautet:

$$\text{MELD} = 10 \{0.957 \ln(\text{Serumkreatinin}) + 0.378 \ln(\text{Bilirubin ges.}) + 1.12 \ln(\text{INR}) + 0.643\}$$

Je höher das Punkteergebnis, desto geringer ist die Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Transplantation. Der Mittelwert des MELD-Scores in der Patientenkohorte betrug $13,8 \pm 6,2$ und erstreckte sich von 6 bis 35 Punkten.

Des Weiteren wurde bei 12 Personen (8%) ein hepatorenales Syndrom diagnostiziert und bei 20 (13%) entwickelte sich im Laufe der Erkrankung eine SBP. Ein TIPS war vor Studienbeginn bei 5 Patienten (3%) implantiert worden.

4.2 Phänotypisierung durch Flimmerfrequenzanalysen

Die Verteilung der CFF-Werte entsprach einer Normalverteilung (Abb. 8). Der durchschnittliche CFF-Wert lag bei $38,98 \pm 5,9$ Hz und erstreckte sich von 26 Hz bis 58 Hz. 74 Patienten (47%) erzielten mit einem CFF-Wert > 39 Hz Normergebnisse bei der Flimmerfrequenzanalyse. Eine minimale HE ($39 \text{ Hz} \geq \text{CFF} > 38 \text{ Hz}$) konnte bei 11 Patienten (7%) festgestellt werden, eine HE ersten Grades ($37,9 \text{ Hz} > \text{CFF} \geq 35 \text{ Hz}$) bei 30 Personen (19%). Aufgrund eines CFF-Ergebnisses unter 35 Hz wurde bei 43 Patienten (27%) eine HE mindestens zweiten Grades diagnostiziert.

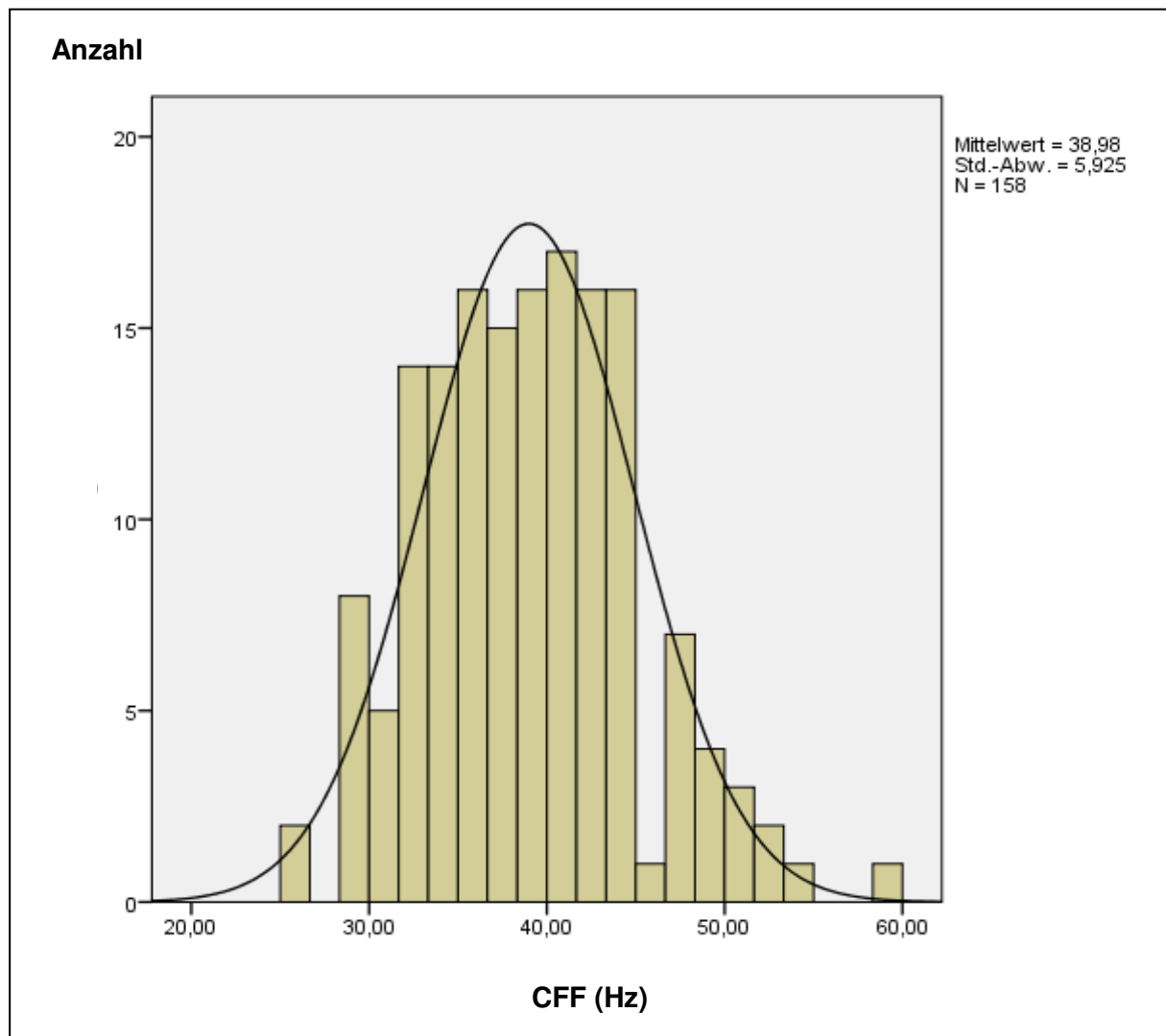


Abb. 8: Verteilung der CFF-Ergebnisse im Patientenkollektiv mit Normalverteilungsdiagramm

4.3 Genotypisierung

Die DNA-Extraktion aus EDTA-Blut gelang bei allen Proben mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit. Für die PCR wurden 2,5 µl DNA verwendet. Mit Hilfe des automatischen Kapillarsequenzierers und der Agarose-Gelelektrophorese wurde die variable Länge des *GLS*-Mikrosatelliten von extrahierter DNA aus Blutproben der 158 Patienten bestimmt. Bei Proben, die ungenügend deutliche Banden in der Agarose-Gelelektrophorese ergaben, wurde erneut eine PCR unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Größe der *GLS*-Amplifikate bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe der Banden des aufgetragenen Molekulargewichtsmarkers sowie des Längenvergleichs der einzelnen Banden untereinander bestimmt (Abb. 9). Bei 17 Patienten konnte auch wiederholt mittels Gelelektrophorese kein eindeutiger *GLS*-Genotyp ermittelt werden.

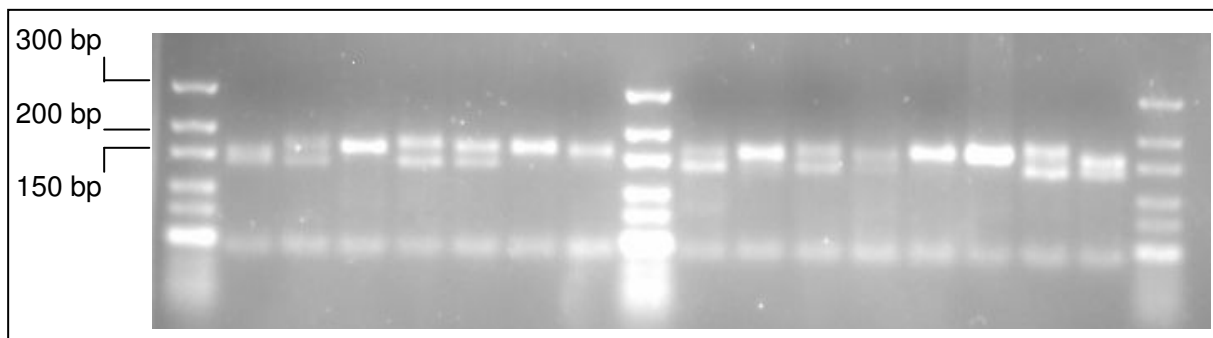


Abb. 9: Repräsentativer Gelausschnitt (4% Agarose) für die Auswertung der PCR zur *GLS*-Genotypisierung von 15 Patientenproben. Patienten mit homozygoten *GLS*-Allelen weisen nur eine Bande, Patienten mit heterozygoten *GLS*-Allelen zwei Banden auf. Die Größe der Standardbanden in Basenpaaren (bp) ist links neben dem Gel aufgetragen.

Anschließend erfolgte der Vergleich der Ergebnisse der Gelelektrophorese und des Kapillarsequenzierers (Abb. 11). Die Resultate wurden in drei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe beschreibt Personen mit heterozygoter *GLS*-Mikrosatelliten-DNA. Dieser *GLS*-Genotyp kann an der Auftrennung von zwei verschiedenen Banden nachgewiesen werden und lag bei 75 Personen (48%) vor. Die anderen beiden Gruppen umfassen die homozygoten *GLS*-Genotypen und können in „kurze“ (zwischen 122 und 126 bp) oder „lange“ (im Bereich von 130 bis 156 bp) genetische Varianten unterteilt werden (Tab. 8). Es konnte bei 51 Patienten (32%) der „lange“ homozygote *GLS*-Genotyp und bei 32 (20%) der „kurze“ detektiert werden (Abb. 10).

heterozygot	homozygot	
	lang	kurz
124-131 bp 141-169 bp	130-156 bp	122-126 bp

Tab. 8: *GLS*-Mikrosatelliten-Genotypisierung entsprechend dieses Schemas gemäß den Ergebnissen der Gelelektrophorese und des Kapillarsequenzierers

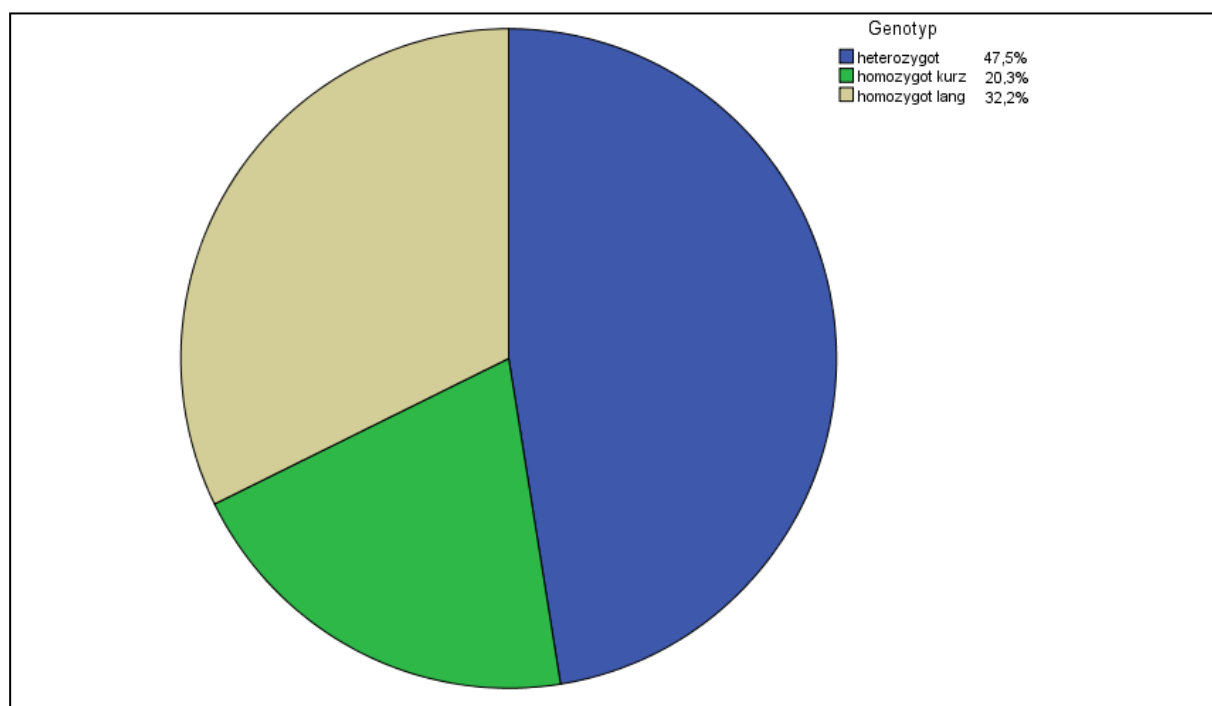


Abb. 10: Häufigkeiten (%) der drei *GLS*-Genotypen im Patientenkollektiv

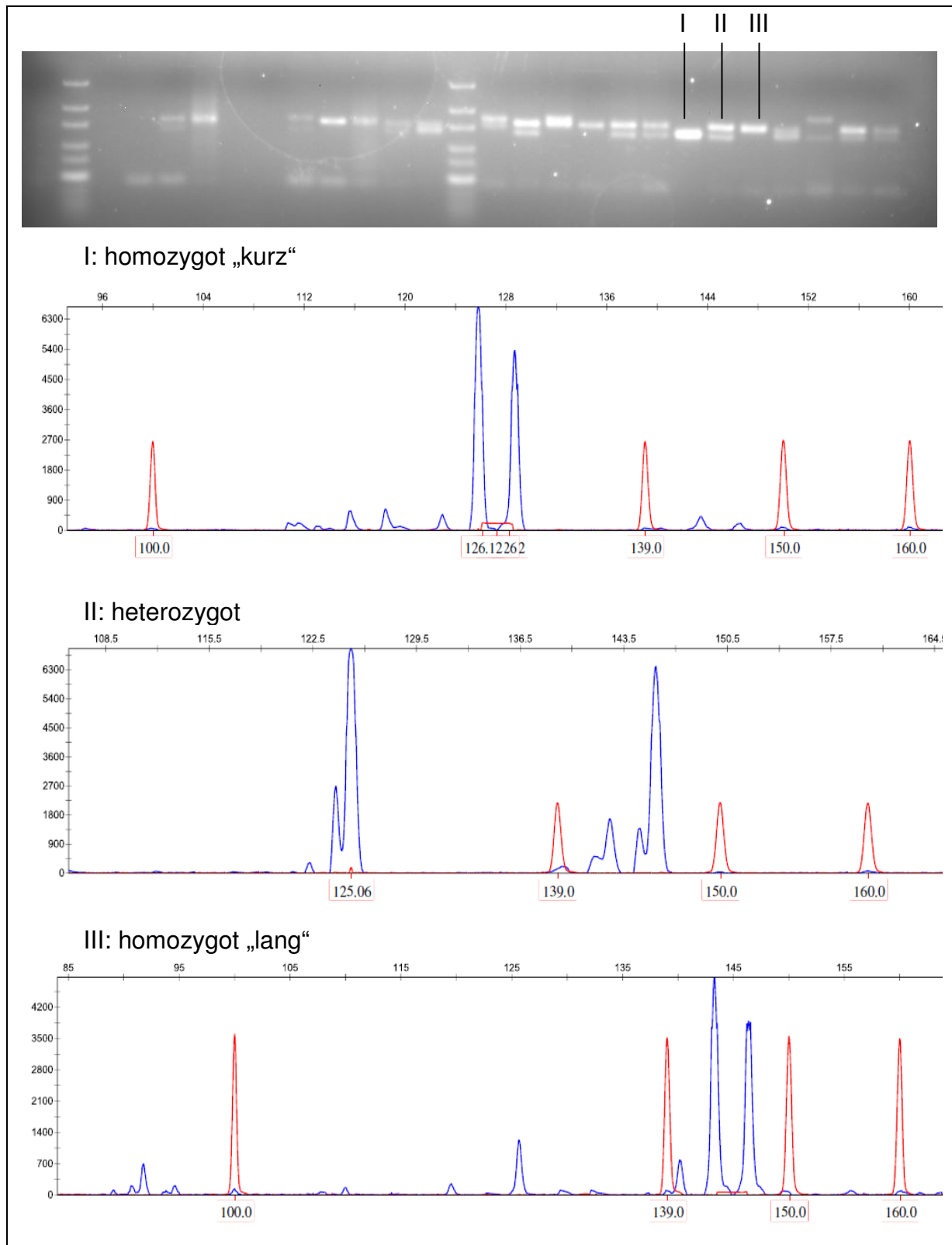


Abb. 11: Gelelektrophorese und entsprechende Ergebnisse der genetischen Analyse der exemplarisch markierten Proben I - III (roter Ausschlag = Standard, blauer Ausschlag = DNA-Proben, Abszisse in bp, Ordinate mit Fluoreszenz-Intensität)

4.4 Statistische Analysen von Geno- und Phänotypen

4.4.1 Prüfung der Genotypen auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Um Genotypisierungsfehler auszuschließen, wurde auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht. Bei einer Population, die sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, bleiben die Häufigkeiten der Allele und der Genotypen konstant. Die mathematischen Gleichungen für diese ideale Population lauten:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$
$$p + q = 1$$

p: relative Häufigkeit des Allels A

q: relative Häufigkeit des Allels a

Es erfolgte die Einteilung der Patienten in Fälle (CFF \leq 39 Hz) und Kontrollen (CFF $>$ 39 Hz, Tab. 9).

	Frequenzen der Genotypen (in Prozent)		
	AA	Aa	aa
Fälle	28 (38%)	30 (41%)	15 (21%)
Kontrollen	23 (27%)	45 (53%)	17 (20%)

Tab. 9: Häufigkeiten der *GLS*-Genotypen bei Fällen und Kontrollen. A: „lange“ Mikrosatelliten-Variante, a: „kurze“ Mikrosatelliten-Variante

Abbildung 12 verdeutlicht im De Finetti-Diagramm mit der Hardy-Weinberg-Parabel die Häufigkeiten der *GLS*-Allele und -Genotypen in der Studienkohorte. Die Abszisse spiegelt die Allelfrequenzen der Population, die Ordinate die Frequenz der heterozygoten Patienten (Aa) wider. Für Fälle und Kontrollen lassen sich anhand der beiden Schnittpunkte der gestrichelten Linien die Häufigkeiten der Allele ablesen. Die Frequenz für den Genotyp homozygot „lang“ (AA) ist auf der linken schräg verlaufenden Achse und die Häufigkeit des Genotyps homozygot „kurz“ (aa) auf der rechten schräg verlaufenden Achse dargestellt. Populationen im Hardy-Weinberg-

Gleichgewicht liegen auf oder in der Nähe der Parabel. Es zeigte sich keine Abweichung der Häufigkeiten der *GLS*-Genotypen der Studienpopulation von der gemäß Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Verteilung (alle $p > 0,05$).

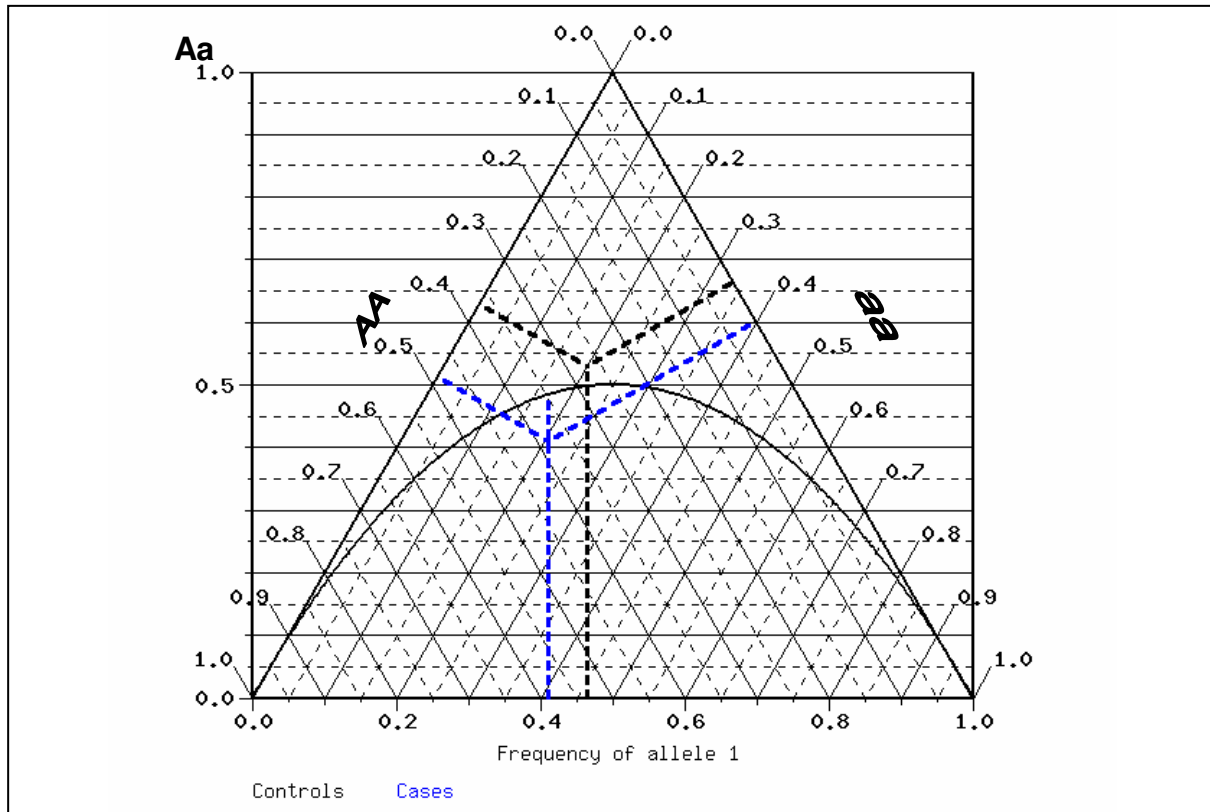


Abb. 12: De Finetti-Diagramm mit den *GLS*-Allel- und Genotypenfrequenzen bei Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz), AA: homozygot „lang“, aa: homozygot „kurz“

Der Chi-Quadrat-Test ist eine gängige statistische Methode, um Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) für biallelische Marker zu entdecken. Bei Genotypen mit niedrigen Frequenzen können diese Tests fälschlicherweise zur Ablehnung oder Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts führen. Lauretto et al. ²⁴ untersuchten eine weitere Methode für multiallelische Tests, welche auf der Bayesschen Wahrscheinlichkeitstheorie basierte. Der multiallelische Signifikanztest FBST (Full Bayesian Significance Test) erwies sich im Vergleich mit bisher üblichen Tests als besonders valide für multiallelische DNA-Loci bei geringer Probenanzahl. Die Ergebnisse der Genotypenverteilung der Studienkohorte wurden daher auch mit Hilfe des Programms FBSTHW auf Abweichungen vom HWE untersucht. Die dabei erreichten p -Werte der *GLS*-Allelfrequenzen für Fälle und Kontrollen zeigten eine Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (alle $p > 0,05$).

4.4.2 Korrelationen der Genotypen mit Phänotypen

4.4.2.1 Korrelationen der Genotypen mit den CFF-Mittelwerten

Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA) lassen sich mehrere unabhängige Stichproben vergleichen. Um Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp aufzuweisen, wurden die Mittelwerte der CFF-Ergebnisse der drei Genotypen-Gruppen untersucht. Der CFF-Mittelwert betrug 40,1 Hz bei Vorliegen heterozygoter Allele und 37,5 Hz bei der Gruppe mit zwei „langen“ Allelen. Die Individuen mit zwei „kurzen“ Allelen wiesen einen Mittelwert von 38,7 Hz auf. Die CFF-Mittelwerte unterschieden sich in Abhängigkeit des Genotypen signifikant ($p = 0,042$, Abb. 13).

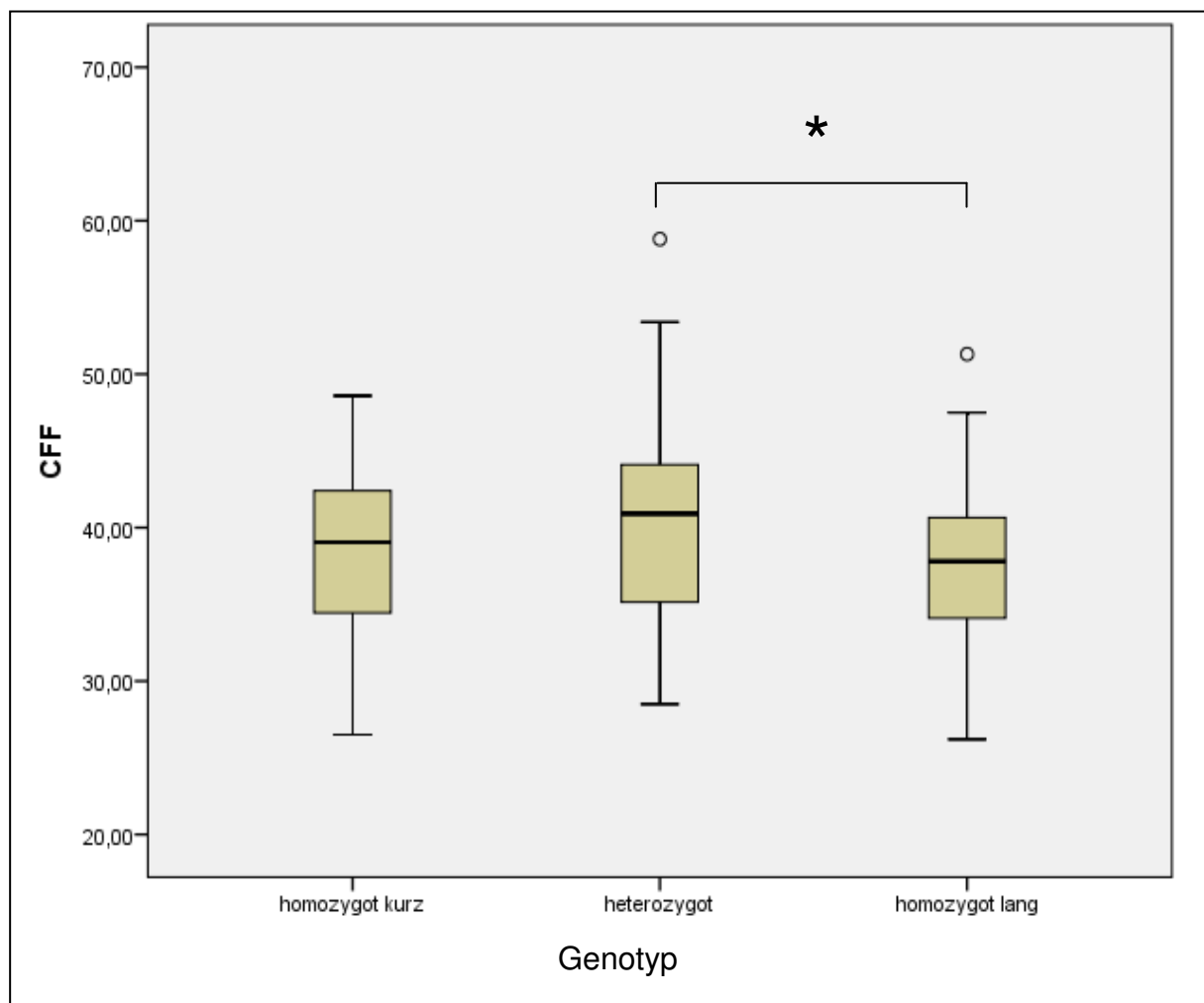


Abb. 13: Darstellung der CFF-Mittelwerte (Hz) in Abhängigkeit des Genotypen

Im Anschluss erfolgte der Post-Hoc-Test mit Korrekturverfahren nach Bonferroni, um die einzelnen Gruppen untereinander zu vergleichen. Die CFF-Mittelwerte der Patientengruppe mit „langen“ homozygoten Allelen unterschieden sich signifikant von denen der Gruppe mit heterozygoten Allelen ($p = 0,038$).

4.4.2.2 Korrelationen der Genotypen mit dem Vorliegen und dem Schweregrad der hepatischen Enzephalopathie

Bei Patienten mit den *GLS*-Genotypen homozygot „kurz“, heterozygot oder homozygot „lang“ trat eine HE tendenziell ($p = 0,078$) unterschiedlich häufig auf (Abb. 14). Patienten mit „langer“ Mikrosatelliten-Variante hatten dabei ein größeres Risiko eine HE zu entwickeln ($OR = 0,439$, $p = 0,02$).

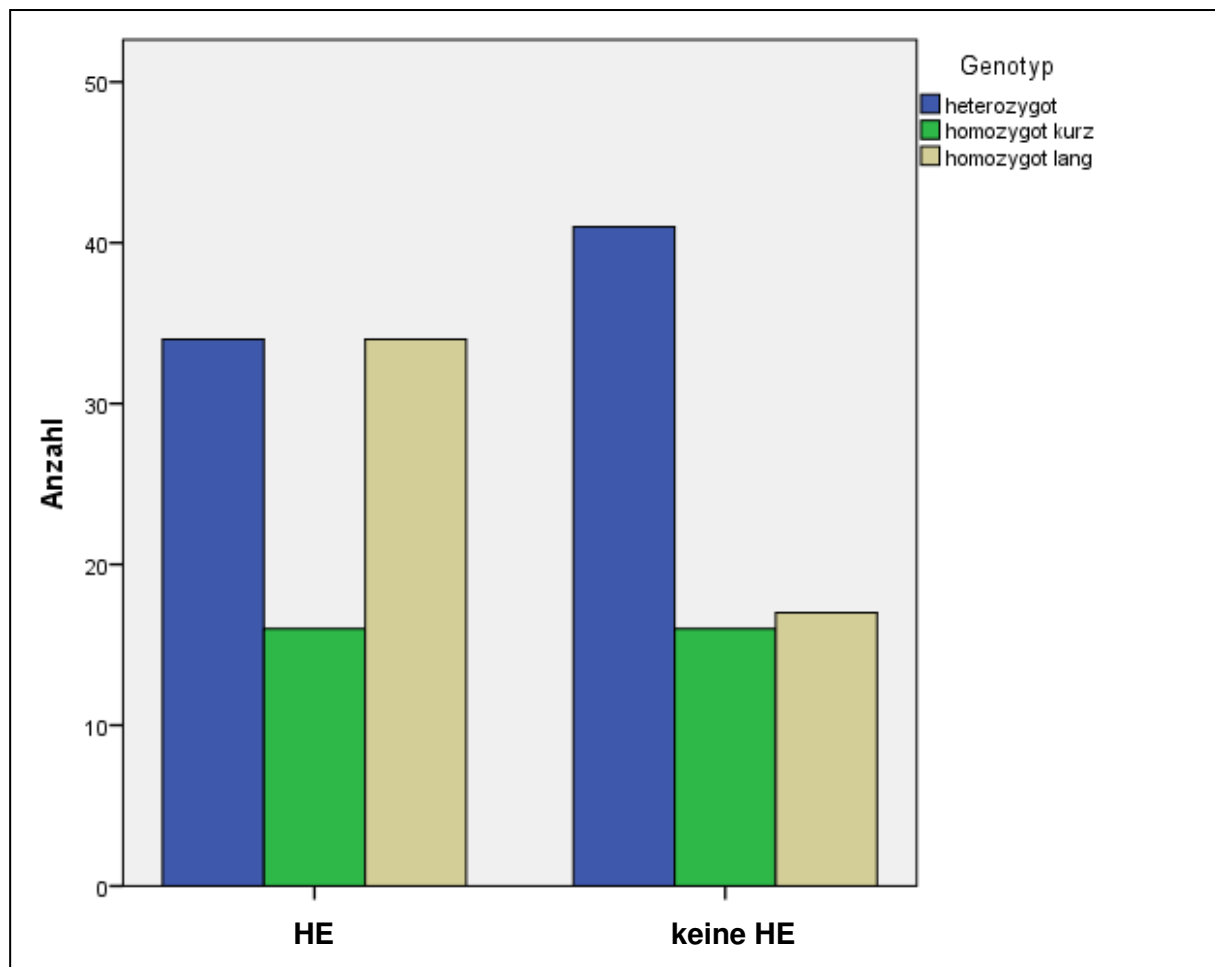


Abb. 14: Anzahl der Patienten mit ($CFF \leq 39$ Hz) und ohne HE ($CFF > 39$ Hz) in Abhängigkeit vom *GLS*-Genotypen

Anschließend wurde die Verteilung der Genotypen bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden der HE analysiert (Abb. 15). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung der drei Genotypen bei Patienten ohne und mit minimaler HE ($p = 0,046$). Ebenso war das Ergebnis signifikant, wenn man die Personen mit minimaler und erstgradiger HE zusammenfasste und mit der Patientengruppe mit normwertigen CFF-Werten verglich ($p = 0,042$).

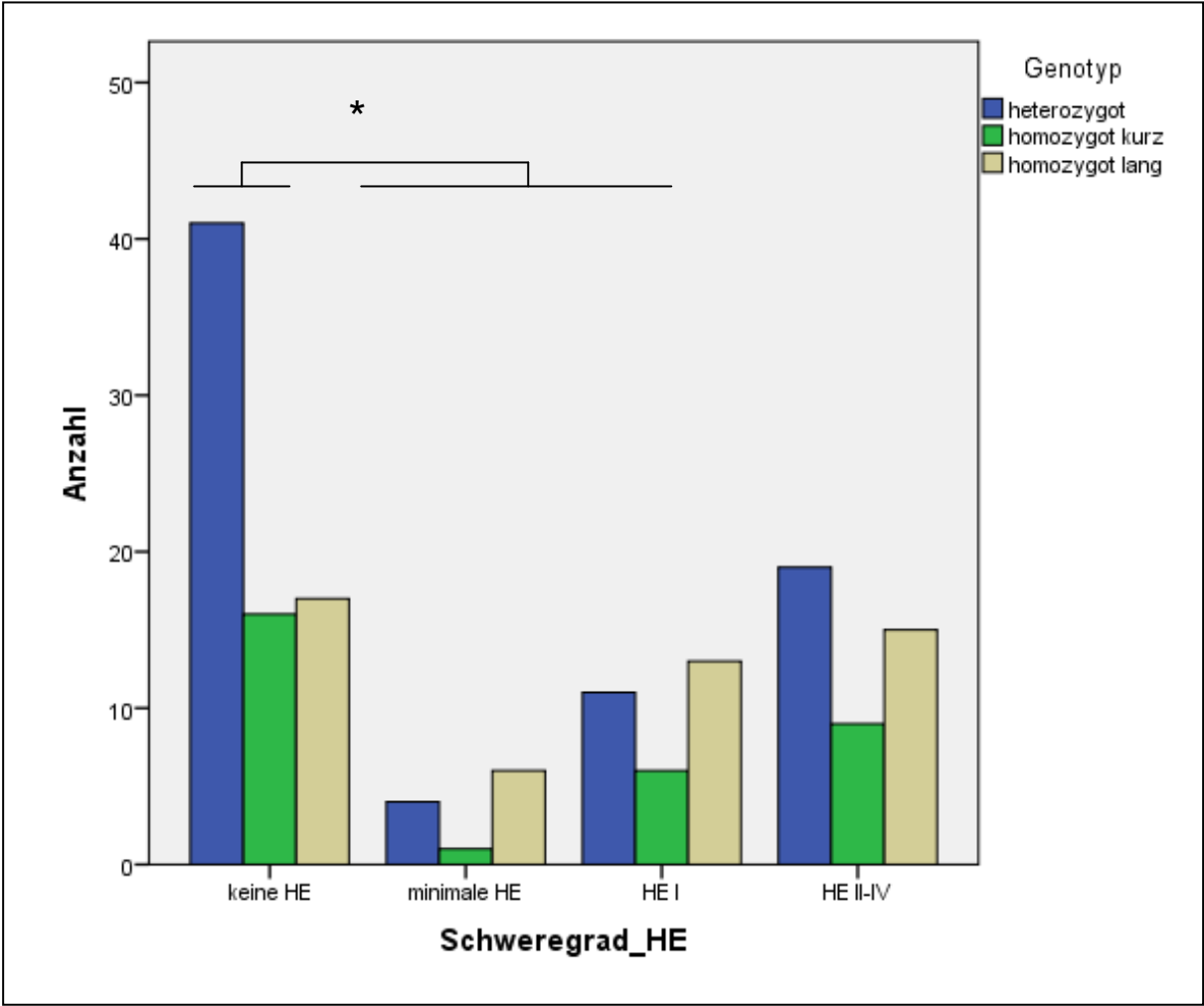


Abb. 15: Anzahl der Patienten mit verschiedenen *GLS*-Genotypen in Abhängigkeit vom Schweregrad der HE

4.4.2.3 Korrelationen der Genotypen mit weiteren Komplikationen der Leberzirrhose

Es wurde das Auftreten einer SBP als Komplikation der Leberzirrhose bei Patienten mit verschiedenen *GLS*-Genotypen untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03$, Abb. 16). Träger von zwei „langen“ Allelen entwickelten signifikant häufiger eine SBP als Träger der anderen beiden Genotypen ($p = 0,005$, OR = 0,263).

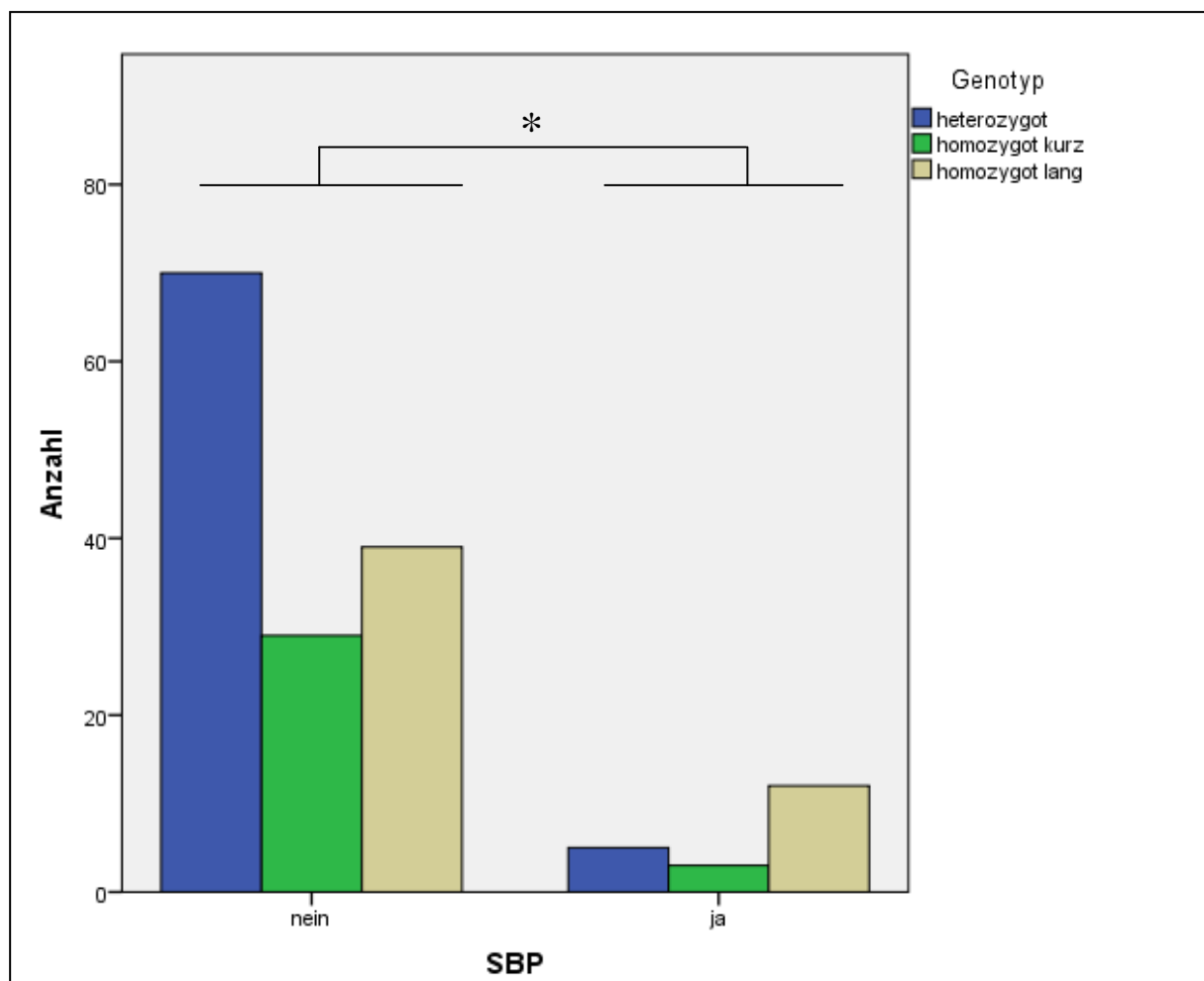


Abb. 16: Vorkommen und Häufigkeit der Komplikation SBP in Abhängigkeit der *GLS*-Genotypen

Das Vorkommen des hepatorenalen Syndroms unter den Genotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede (alle $p > 0,05$).

4.4.2.4 Korrelationen der Genotypen mit Laborparametern und Child-Pugh-Punkten

Die Varianzanalyse der Mittelwerte der laborchemischen Parameter ergab keine Unterschiede für Bilirubin, Albumin, Quick-Wert, Kreatinin, Child-Pugh-Punkte oder MELD-Score in Abhängigkeit von den *GLS*-Genotypen (alle $p > 0,05$). Beim Vergleich der Child-Pugh-Punkte zwischen Trägern verschiedener Genotypen zeigte sich ein Trend für eine höhere Punktezahl bei Patienten mit zwei „langen“ Allelen im Vergleich zu heterozygoten Trägern (7,5 vs. 7,15, Abb. 17). Bei der Untersuchung der Häufigkeiten der Child-Pugh-Stadien in Abhängigkeit vom Genotyp fanden sich keine Unterschiede.

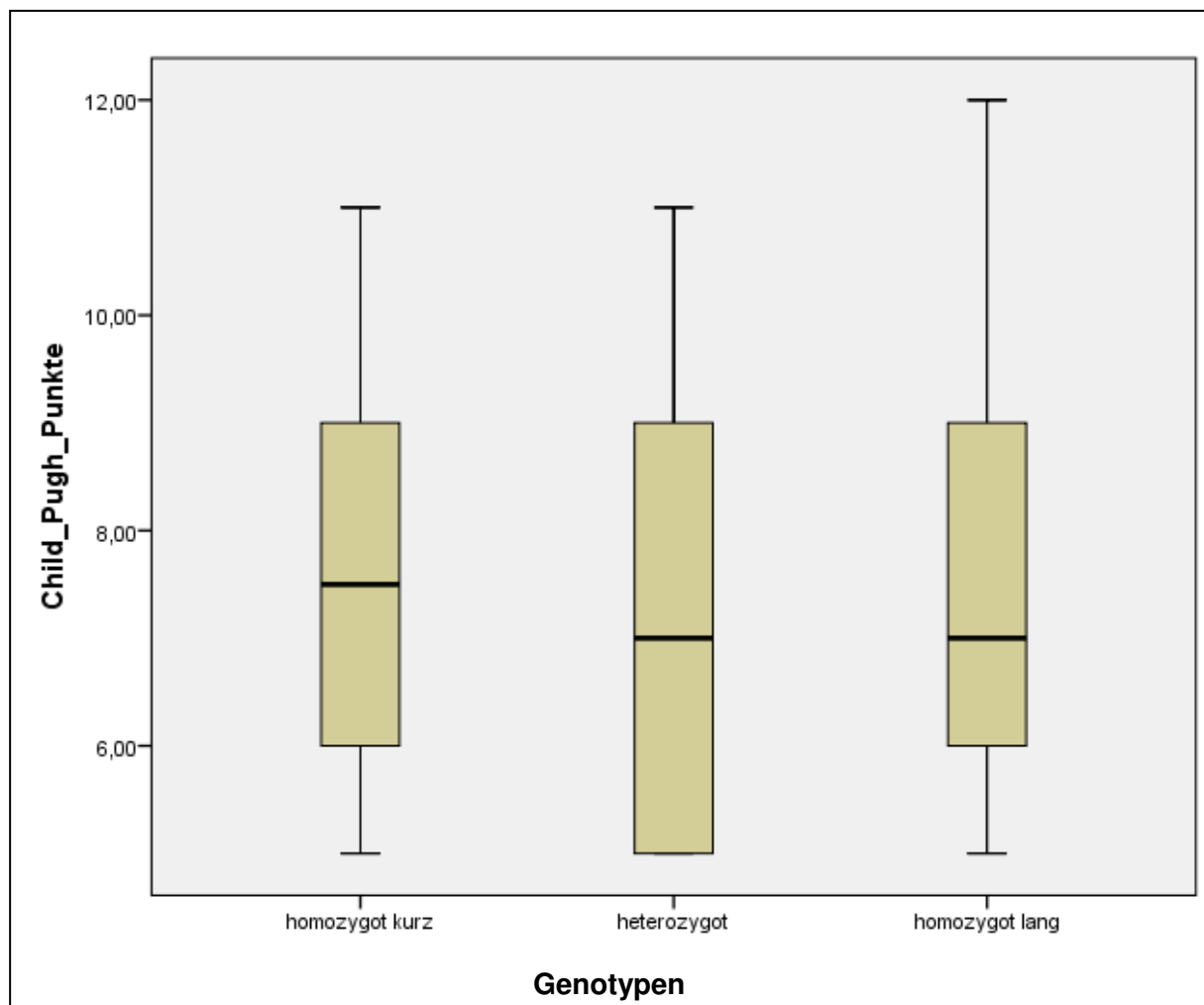


Abb.17: Child-Pugh-Mittelwerte der Patienten mit verschiedenen Genotypen

4.4.3 Korrelationen der laborchemischen Parameter

Die laborchemischen Daten wurden auf bivariate Korrelationen untersucht (Tab. 10). Die Korrelationsanalysen zeigten einen signifikanten Zusammenhang der CFF-Werte mit Ammoniak ($p = 0,045$, Abb. 19), Serumalbumin ($p < 0,01$, Abb. 20), Kreatinin ($p = 0,004$), Serumnatrium ($p = 0,001$) und MELD-Score ($p = 0,001$). Ebenfalls signifikant korrelierte Ammoniak mit Natrium ($p = 0,047$) und MELD-Score ($p = 0,026$). Ein signifikanter Zusammenhang fand sich zudem zwischen Serumbilirubin und Serumalbumin, Quick-Wert und Natrium (alle $p < 0,01$). Albumin korrelierte signifikant mit Quick-Wert, Serumnatrium und MELD-Score (alle $p < 0,001$). Zwischen Quick-Wert und Natrium zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,024$). Signifikante negative lineare Zusammenhänge stellten sich zwischen Natrium und Child-Pugh-Punkten als auch MELD-Score dar ($p < 0,01$). Zusätzlich fand sich ein negativer signifikanter Zusammenhang zwischen Natrium und Kreatinin ($p < 0,01$).

	CFF (Hz)	Ammoniak (µg/dl)	Bilirubin (mg/dl)	Albumin (g/dl)	Quick (%)	Kreatinin	Natrium (mmol/l)	Child-Pugh-Punkte	MELD-Score
CFF (Hz)	1	-,174*	-,107	,293**	,108	-,229**	,263**	-,519**	-,206*
Korrelation nach Pearson		,045	,187	,000	,187	,004	,001	,000	,011
Signifikanz (2-seitig)		134	155	147	150	155	152	155	153
N	158								
Ammoniak (µg/dl)	-,174*	1	,111	-,075	-,114	,114	-,175*	,040	,195*
Korrelation nach Pearson		,045	,203	,403	,200	,194	,047	,650	,026
Signifikanz (2-seitig)		134	132	125	129	132	129	132	130
N	134								
Bilirubin (mg/dl)	-,107	,111	1	-,259**	-,426**	,147	-,296**	,437**	,722**
Korrelation nach Pearson		,203	,002	,002	,000	,069	,000	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		132	155	147	150	155	152	155	152
N	155								
Albumin (g/dl)	,293**	-,075	-,259**	1	,513**	-,134	,365**	-,520**	-,471**
Korrelation nach Pearson		,403	,002	,147	,000	,104	,000	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		125	147	147	142	147	145	147	144
N	147								
Quick (%)	,108	-,114	-,426**	,513**	1	-,041	,187*	-,593**	-,691**
Korrelation nach Pearson		,200	,000	,000	,618	,024	,024	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		150	150	142	150	150	147	150	150
N	150								
Kreatinin	-,229**	,114	,147	-,134	-,041	1	-,287**	,224**	,508**
Korrelation nach Pearson		,194	,069	,104	,618	,005	,000	,005	,000
Signifikanz (2-seitig)		132	155	147	150	155	152	155	152
N	155								
Natrium (mmol/l)	,263**	-,175*	-,296**	,365**	,187*	-,287**	1	-,380**	-,373**
Korrelation nach Pearson		,047	,000	,000	,024	,000	,000	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		152	152	145	147	152	152	152	149
N	152								
Child-Pugh-Punkte	-,519**	,040	,437**	-,520**	-,593**	,224**	-,380**	1	,700**
Korrelation nach Pearson		,650	,000	,000	,000	,005	,000	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		155	155	147	150	155	152	155	152
N	155								
MELD-Score	-,206*	,195*	,722**	-,471**	-,691**	,508**	-,373**	,700**	1
Korrelation nach Pearson		,026	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Signifikanz (2-seitig)		153	152	144	150	152	149	152	153
N	153								

Tab. 10: Korrelationsanalyse der laborchemischen Parameter

*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

**: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

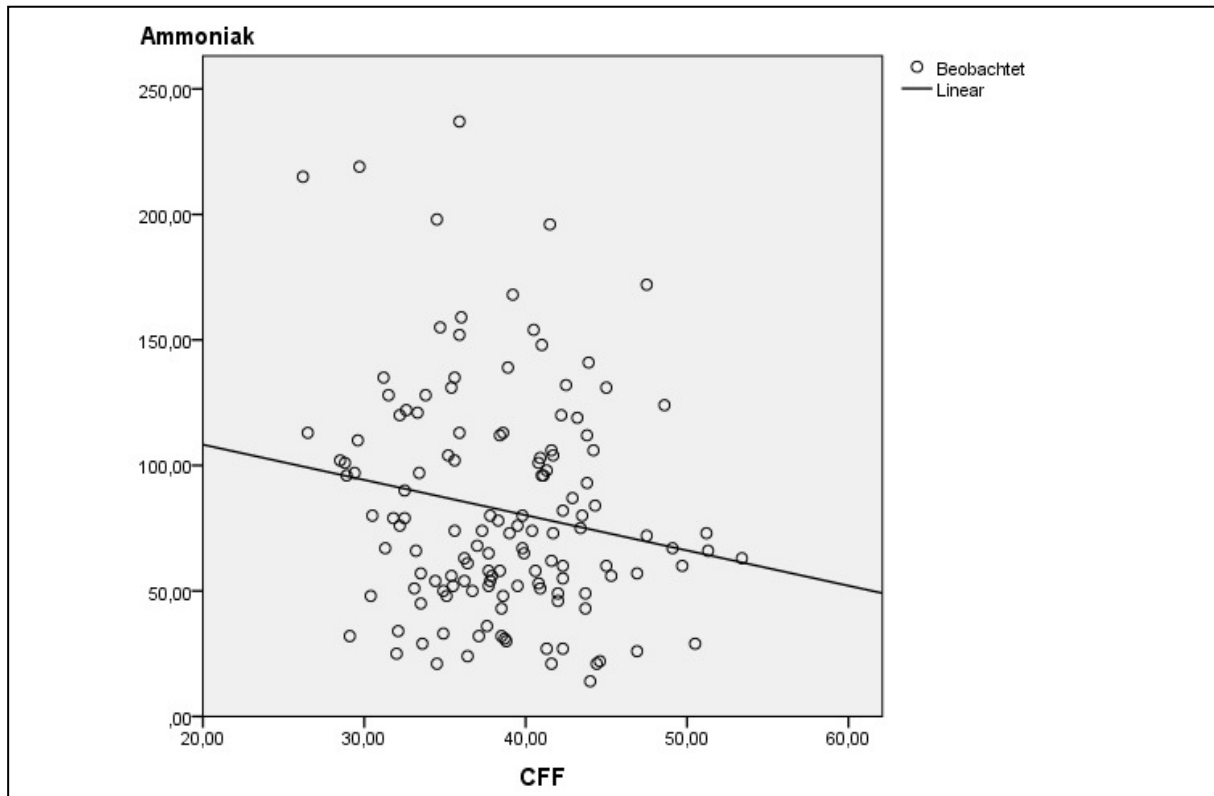


Abb.19: Korrelation der CFF-Werte (Hz) mit Ammoniak ($\mu\text{g/dl}$)

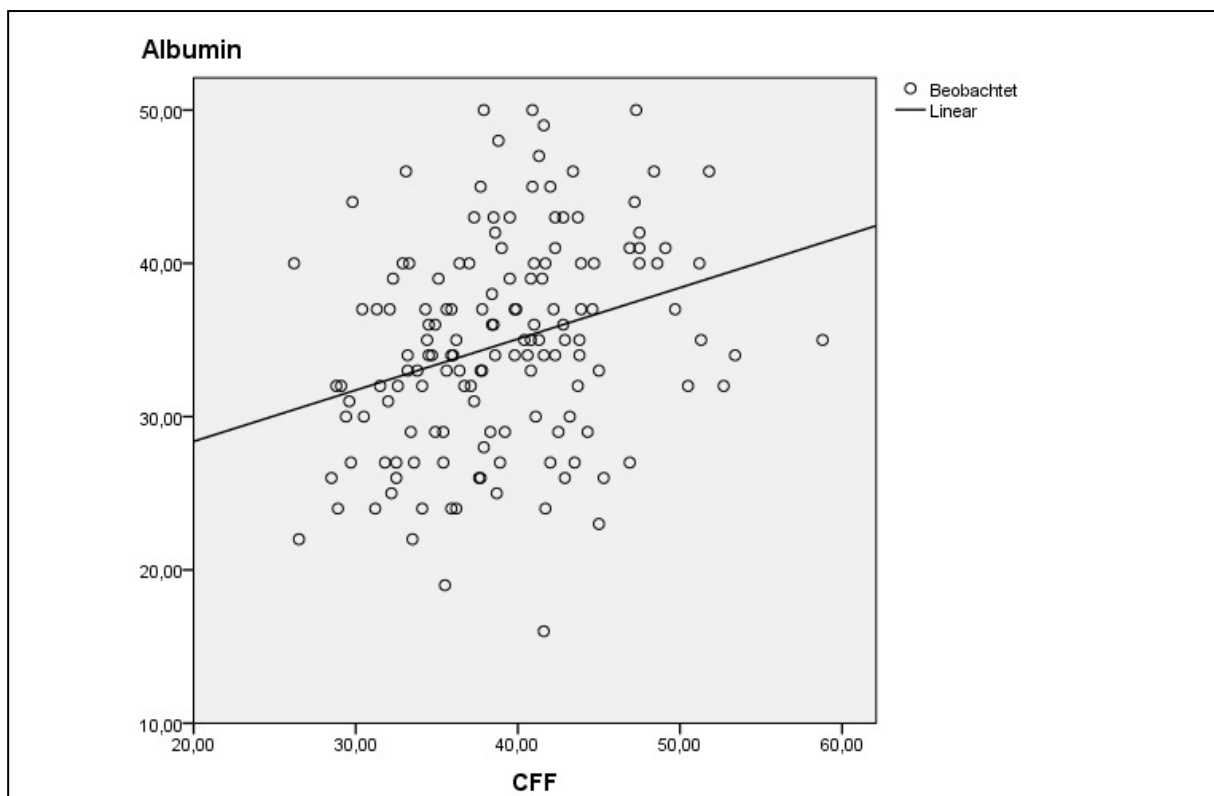


Abb. 20: Korrelation der CFF-Werte (Hz) mit Serumalbumin (g/dl)

Patienten mit Hyponatriämie (Serumnatrium < 135 mmol/l) wiesen einen CFF-Mittelwert von 37,1 Hz, Patienten mit normwertigen Natriumwerten (135 - 145 mmol/l) einen Mittelwert von 39,8 Hz auf. Die CFF-Mittelwerte unterschieden sich signifikant ($p = 0,01$, Abb. 21). Dies bestätigte das Ergebnis der Korrelationsanalyse für CFF-Werte und Natrium (Tab.10).

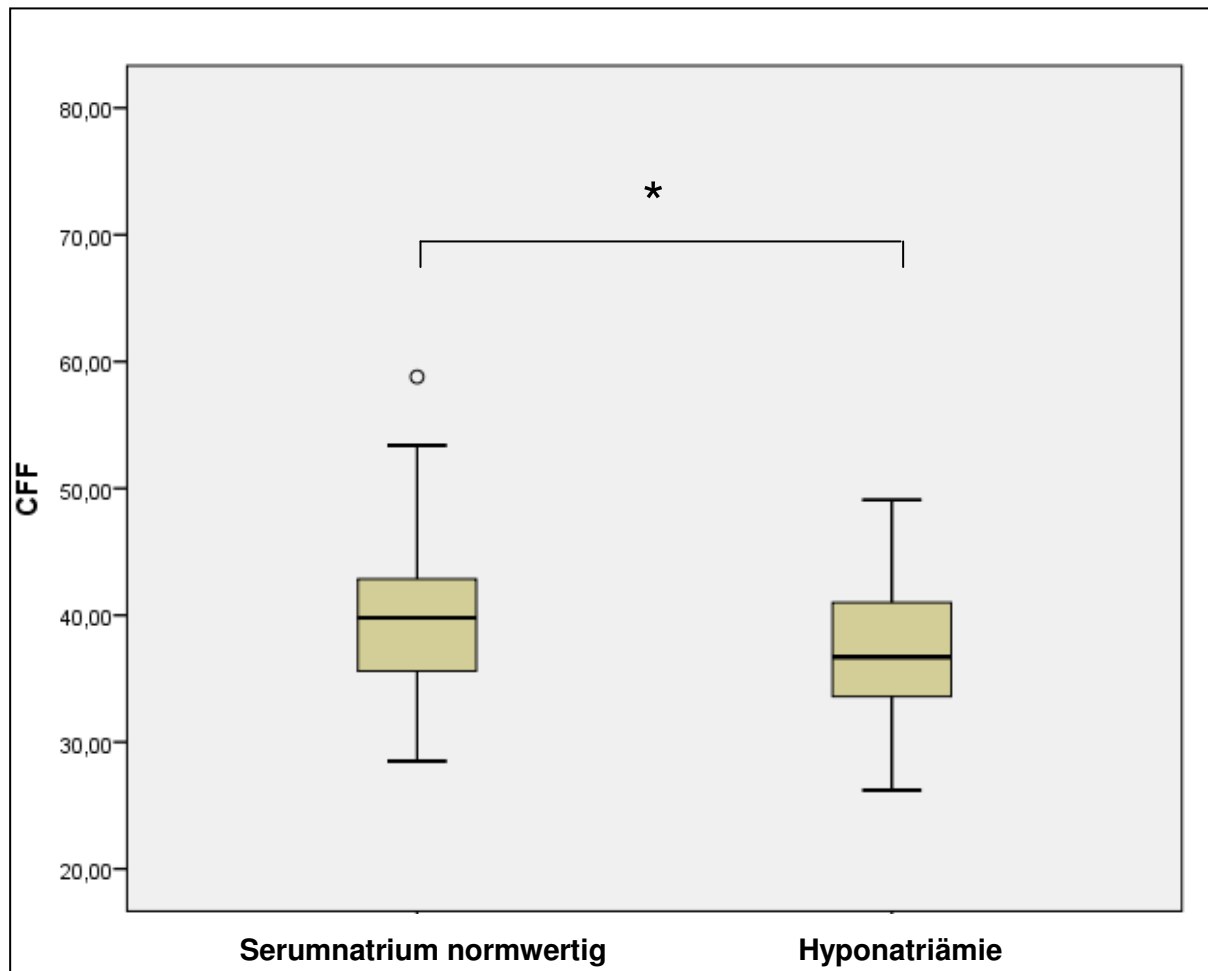


Abb. 21: CFF-Mittelwerte von Patienten mit und ohne Hyponatriämie

4.4.4 Zusammenhang von Alter und Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie

Der Mittelwert des Alters der 74 Patienten, die keine HE entwickelten, betrug 56,6 Jahre. Die 84 Patienten, bei denen eine HE diagnostiziert wurde, waren im Durchschnitt 61,6 Jahre alt. Die Mittelwerte unterschieden sich mit dem t-Test signifikant ($p = 0,01$, Abb. 22). Zwischen zunehmendem Alter und der Entwicklung einer HE bestand somit im Patientenkollektiv ein signifikanter Zusammenhang.

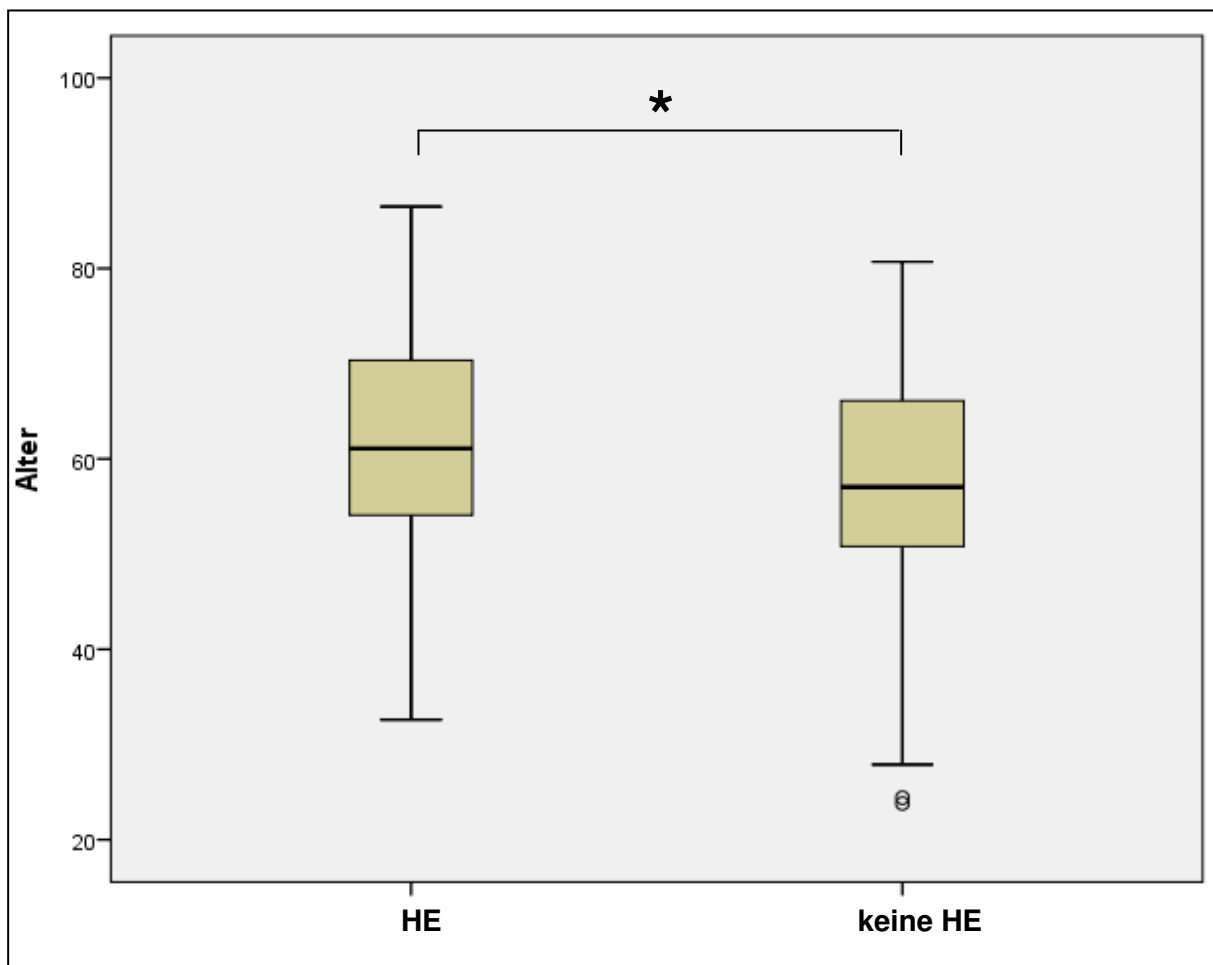


Abb. 22: Vergleich des Alters von Patienten mit und ohne HE

4.4.5 Verbindung zwischen Ätiologie der Leberzirrhose und Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie

Bei der Mehrheit der Patienten (N = 93) in der Kohorte lag eine Leberzirrhose äthyltoxischer Genese vor. Zwischen dem Auftreten einer HE und einer Leberzirrhose äthyltoxischer Genese konnte ein signifikanter Zusammenhang gefunden werden ($p = 0,03$, Abb. 23). Analysen der Leberzirrhose anderer Ätiologie ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

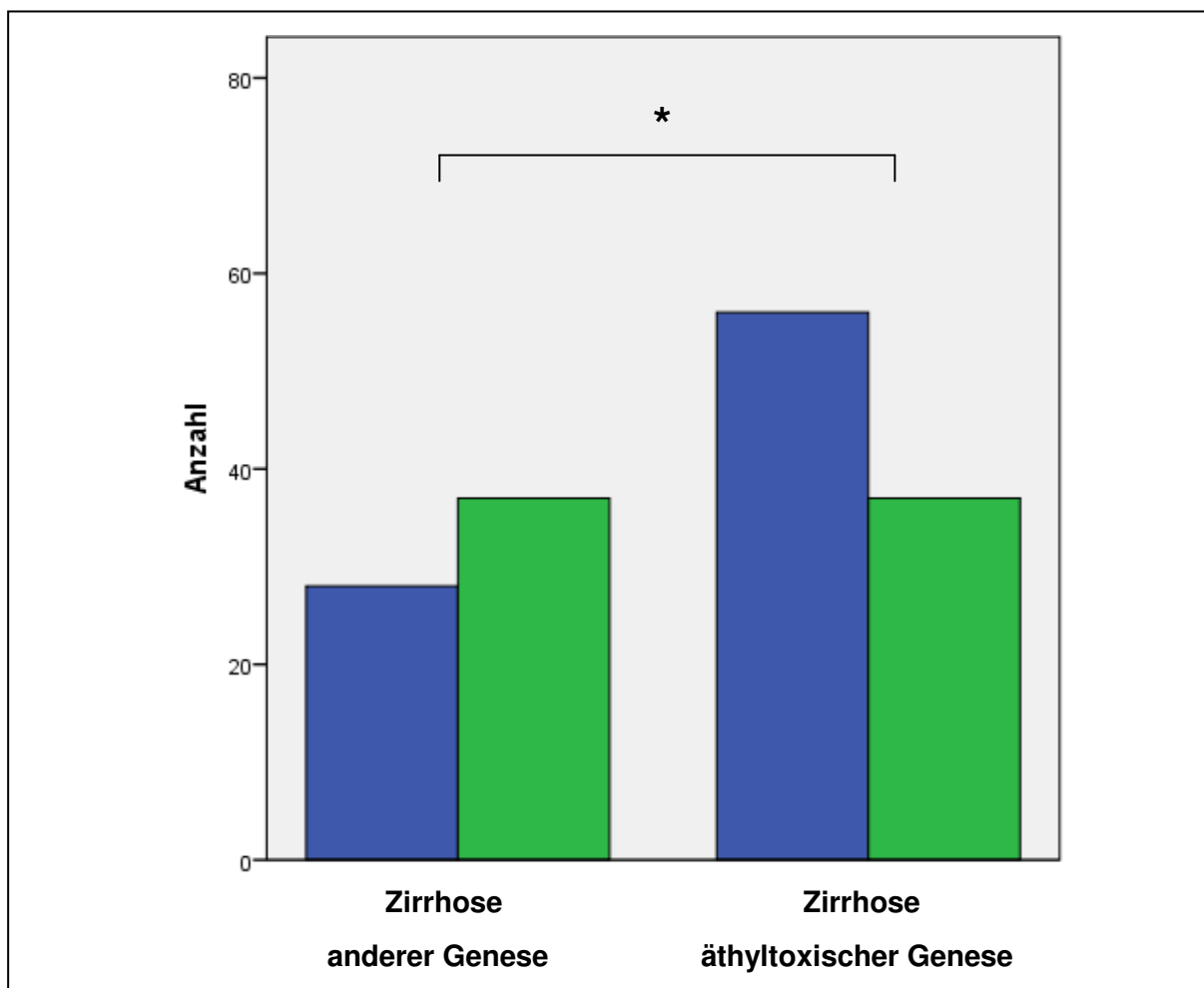


Abb. 23: Patientenanzahl mit (blau) und ohne HE (grün) in Abhängigkeit der Genese der Leberzirrhose

4.4.6 Veränderte CFF-Werte nach Therapie der portalen Hypertension

Bei fünf Patienten war vor Einschluss in die Studie ein transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt angelegt worden. Diese erzielten im Durchschnitt niedrigere CFF-Ergebnisse als Patienten ohne TIPS (37,8 Hz vs. 39,0 Hz, $p > 0,05$, Abb. 24).

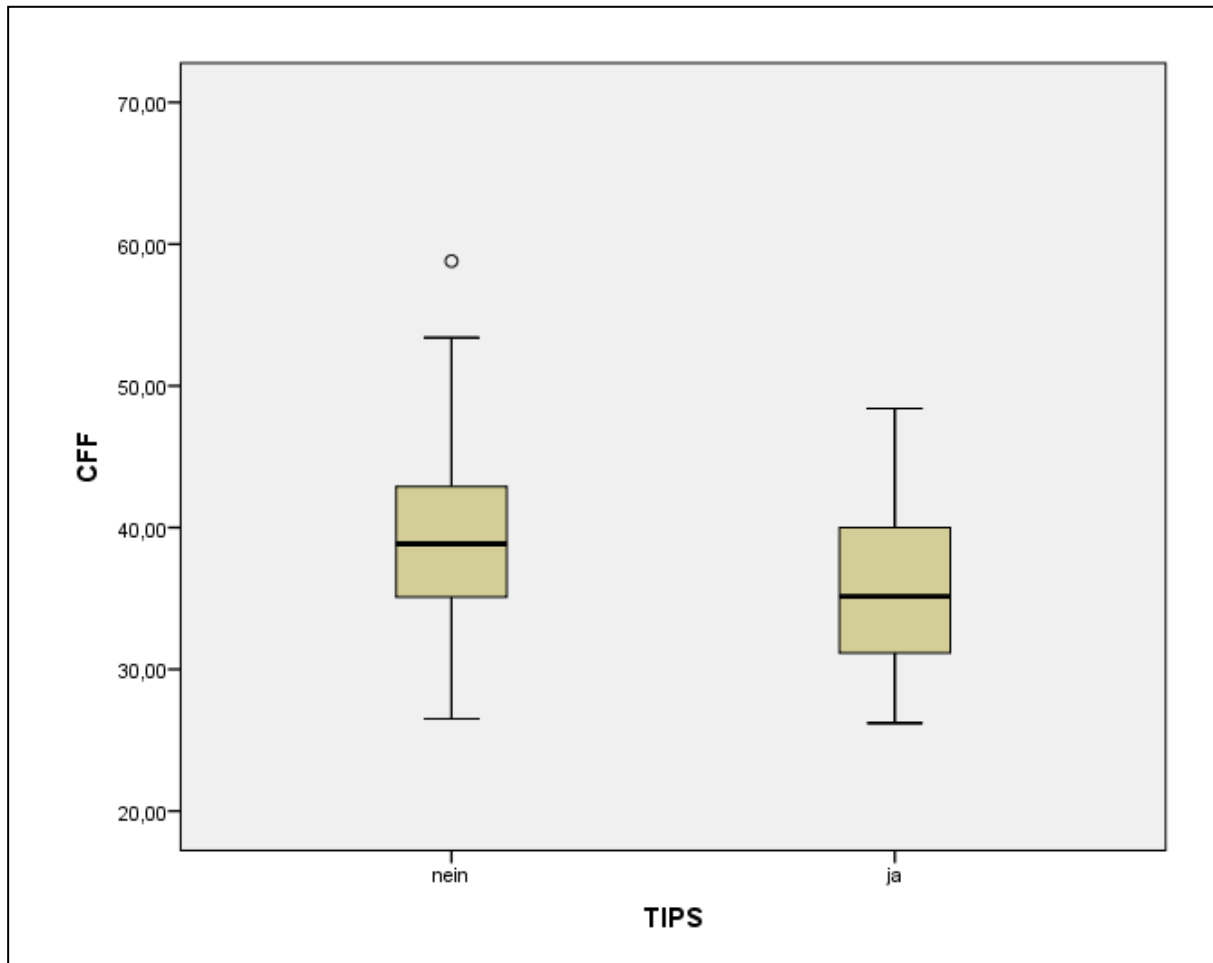


Abb. 24: CFF-Mittelwerte (Hz) bei Patienten ohne und mit TIPS

4.4.7 Univariate Regressionsanalysen

Für den CFF-Wert als abhängige Variable wurde zunächst eine univariate Regressionsanalyse unter Einschluss des *GLS*-Genotypen homozygot „lang“ durchgeführt. Das Ergebnis ($p = 0,025$, Tab. 11) bestätigte den bereits signifikanten t-Test: Für den MELD-Score ($p = 0,01$) und Natrium im Serum ($p = 0,001$) als Einflussvariablen auf den CFF-Wert fand sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang.

Einflussvariable	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	95% Konfidenzintervall (KI) für B		p
			Untergrenze	Obergrenze	
homozygot „lang“	-2,252	0,995	-4,217	-0,286	0,025
MELD-Score	-0,197	0,076	-0,347	-0,047	0,011
Natrium	0,305	0,091	0,124	0,485	0,001

Tab. 11: Univariate Regressionsanalyse mit CFF als abhängige Variable und homozygot „langer“ Genotyp, MELD-Score und Natrium als unabhängige Variablen

Die binär logistische Regressionsanalyse für das Vorliegen bzw. die Abwesenheit der HE zeigte ein signifikantes Ergebnis für den homozygot „langen“ Genotyp ($p = 0,02$) als Einflussvariable (Tab. 12). Es ergab sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer HE und dem Alter als Risikofaktor ($p = 0,01$). Von den Laborparametern fand sich ein signifikantes Ergebnis für Natrium als möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer HE ($p = 0,01$). Des Weiteren war die äthyltoxische Genese der Leberzirrhose signifikant mit dem Auftreten einer HE assoziiert ($p = 0,035$).

Einflussvariable	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Exp(B)	95% KI für Exp(B)		p
				Untergrenze	Obergrenze	
homozygot „lang“	-0,824	0,355	0,439	0,219	0,879	0,02
Alter	-0,034	0,014	0,966	0,940	0,993	0,01
Natrium	0,085	0,034	1,088	1,017	1,164	0,01
äthyltoxische Genese	-0,693	0,328	0,5	0,263	0,951	0,035

Tab. 12: Univariate Regressionsanalyse mit dem Vorliegen bzw. der Abwesenheit einer HE als abhängige Variable und den unabhängigen Variablen homozygot „langer“ Genotyp, Alter, Natrium und äthyltoxische Genese der Leberzirrhose

4.4.8 Multiple Regressionsanalysen

Die in den univariaten Testreihen identifizierten Parameter wurden anschließend in einer multiplen Regressionsanalyse untersucht, um sie von redundanten Einflussfaktoren zu unterscheiden. Unterschiede in den CFF-Ergebnissen ließen sich nach der Regressionsanalyse durch den homozygot „langen“ Genotyp und Natrium im Serum signifikant unabhängig voneinander erklären (Tab. 13).

	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	T	p
homozygot „lang“	-2,925	0,976	-2,998	0,003
Natrium	0,341	0,090	3,801	0,000

Tab. 13: Multiple Regression für den CFF-Wert als abhängige Variable mit den unabhängigen Variablen homozygot „langer“ Genotyp und Natrium im Serum

Mit dem Auftreten einer HE waren der homozygot „lange“ Genotyp, eine äthyltoxische Genese der Leberzirrhose sowie das Alter signifikant unabhängig voneinander verknüpft (Tab. 14).

	Regressions- koeffizient B	Standard- fehler	Exp(B)	p
homozygot „lang“	-0,996	0,378	0,369	0,008
äthyltoxische Genese	-0,815	0,348	0,443	0,02
Alter	-0,039	0,014	0,962	0,007

Tab. 14: Multiple Regression mit dem Auftreten einer HE als abhängige Variable und homozygot „langer“ Genotyp, äthyltoxische Genese der Leberzirrhose und Alter als unabhängige Variablen

5. Diskussion

Die HE gilt als eine komplexe neuropsychiatrische Komplikation der Leberzirrhose und ist mit einer erhöhten Mortalität der von ihr betroffenen Patienten verbunden⁹. Mehrere Pathomechanismen werden mit dem Auftreten einer HE in Verbindung gebracht, insbesondere die Hyperammonämie oder Entzündungsprozesse. Welche Rolle die Bildung von Ammoniak durch die intestinale Glutaminsaminierung spielt, war bisher unklar. 2009 wurde erstmals eine Assoziation zwischen einem Mikrosatelliten in der *GLS*-Promotorregion und der Entwicklung einer HE beschrieben⁴³. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die beschriebene *GLS*-Variante einen genetischen Risikofaktor für die Entwicklung einer HE darstellt. Insgesamt wurden 158 Patienten mit Leberzirrhose auf DNA-Längenunterschiede im Promotorbereich des Glutaminase-Gens untersucht. Zur Phänotypisierung und Quantifizierung der HE diente in der vorliegenden Studie die Flimmerfrequenzanalyse. Die Genotypisierung wurde mit Hilfe von Gelelektrophorese und Kapillarsequenzierung durchgeführt. In der weiteren Analyse konnte belegt werden, dass sich die CFF-Mittelwerte bei Patienten mit verschiedenen *GLS*-Genotypen signifikant unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit der „langen“ Mikrosatelliten-Variante ein höheres Risiko für die Entwicklung einer HE hatten. Die Häufigkeiten der Genotypen bei Patienten ohne HE und Patienten mit pathologischen CFF-Werten unterschieden sich signifikant voneinander. Das Auftreten einer HE war signifikant mit dem homozygot „langen“ Genotyp, dem Alter und der äthyltoxischen Genese der Leberzirrhose assoziiert. In der multiplen Regressionsanalyse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass *GLS*-Genotypen und Serumnatrium die CFF-Werte unabhängig voneinander beeinflussen.

Die signifikanten Ergebnisse der Korrelationsanalysen spiegeln die Resultate von Kircheis et al. wider²³. Bereits 2002 konnte eine enge Korrelation zwischen CFF-Werten und Ammoniak nachgewiesen werden. Bei einer Grenzfrequenz von 39 Hz lässt die kritische Flimmerfrequenzanalyse die Diagnose einer klinisch manifesten HE mit einer Sensitivität von 96% und Spezifität von 77% zu⁴⁸. Kircheis et al.²³ wiesen auf die geringe Abhängigkeit der Flimmerfrequenzanalyse von Alter und Tageszeit hin. Ebenso zeigten sich geringe Einflüsse durch Trainingseffekte oder

Bildungsgrad. Im Gegensatz zum Number Connection Test erwies sich die Flimmerfrequenzanalyse als gut reproduzierbar, vergleichbar mit evozierten akustischen Potenzialen⁴². Die Ergebnisse der Flimmerfrequenzanalyse korrelierten darüber hinaus gut mit psychometrischen Tests³⁹. Ein weiterer Vorteil ist die einfache und schnelle Handhabung.

Zusammenfassend konnten durch die Regressionsanalysen signifikante Effekte des homozygoten „langen“ *GLS*-Promotor-Genotyps, des Alters, einer äthyltoxischen Genese der Zirrhose und des Serumnatriums auf das Auftreten einer HE bzw. auf die CFF identifiziert werden. Bismuth et al.⁹ vermuteten bereits eine Verbindung zwischen HE und Hyponatriämie, wobei die pathophysiologische Verbindung der beiden Faktoren in der Astrozytenschwellung gesehen wurde. Die Rolle der Glutaminase wird in der Pathogenese der HE zunehmend kontrovers diskutiert. Sharifi et al.⁴⁷ entdeckten bei akutem Leberversagen erstmalig ausschließlich in Neuronen eine erhöhte Proteinexpression der L-Typ Glutaminase, was letztendlich zum neuronalen Zelltod führt. Damit entkräftete die englische Arbeitsgruppe die Hypothese von Albrecht et al.². Für diese stellte Glutamin eine Art „Trojanisches Pferd“ dar, welches zur Apoptose von Astrozyten führt.

Der Nachweis einer genetischen Risikovariante könnte die Erklärung der mit Hilfe oraler Glutamintests bei Patienten mit Leberzirrhose festgestellten Aktivitätserhöhung der Glutaminase darstellen⁴⁴. Auch in anderen Studien wurden bei Patienten mit Leberzirrhose eine Aktivitätserhöhung der Glutaminase²⁶ sowie als Konsequenz davon eine Erhöhung der Ammoniakkonzentrationen im Serum⁵² festgestellt. Die erhöhte Glutaminase-Aktivität durch eine spezifische genetische Veränderung bestätigt die seit langem bekannte Ammoniakhypothese im Pathogenesemodell der HE^{25, 37, 39, 50}. Dazu passen die erniedrigten Glutaminspiegel, welche bei Patienten mit einer HE detektiert wurden⁴². Der resultierende Glutamatüberschuss und das damit verbundene Vorkommen exzitatorischer Neurotransmitter begünstigen die HE-typischen Symptome. Die Ammoniakwerte waren nur bei wenigen unserer Patienten erhöht. Dies erschwerte die Detektion eines signifikanten Zusammenhangs zwischen der Risikovariante und einer erhöhten Ammoniakkonzentration. Allerdings wurde in anderen Studien gezeigt, dass die Hyperammonämie allein nicht Ursache der HE-typischen Klinik sein kann. Nur das gemeinsame Auftreten von Hyperammonämie und Entzündungsaktionen ging mit kognitiver Beeinträchtigung einher¹⁸. Miller et

al. ³⁰ bestätigten dies, indem sie eine erhöhte Glutaminaseaktivität in neuronalen Zellkörpern im Zusammenhang mit systemischer Inflammation feststellten.

Träger der genetischen Risikovariante entwickelten als weitere Komplikation der Leberzirrhose signifikant häufiger eine SBP. Glutamin und der Lymphozyten-Glutaminase wurde bereits von McCauley et al. ²⁹ eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Kontrolle von Infektionen des Darms zugeschrieben. Für die Entwicklung einer SBP wurde kürzlich Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (*NOD2*) als genetischer Risikofaktor identifiziert ⁵. Zwischen *NOD2* und HE wiederum konnten wir keine signifikante Assoziation detektieren ²⁸. Mehrfach gelang es hingegen zu zeigen, dass Patienten mit TIPS-Anlage zur Entwicklung einer HE neigen ⁴¹. Auch der Vergleich der erzielten CFF-Werte von Patienten mit und ohne TIPS-Anlage in der vorliegenden Kohorte ergab einen Trend für niedrigere CFF-Werte nach TIPS-Anlage. Ein signifikantes Ergebnis wäre vermutlich mit einer größeren Fallzahl nachweisbar gewesen.

Bisher wurden weder für die Leberzirrhose noch für die Entwicklung der Zirrhose-Komplikationen systematisch potenzielle Risikogene untersucht. Ebenso selten sind Studien zur protektiven Wirkung bestimmter Sequenzvarianten wie des *B1B1*-Genotypen des Tumornekrosefaktors- α bei akutem Leberversagen und schwerer HE ⁸. Nachfolgende Studien, die genetische Korrelationen wie den modifizierenden Effekt des 159C/T-Polymorphismus in der Promotorregion des *CD14*-Gens auf IgE-Serumspiegel bei Alkoholkonsum ¹² replizieren, fehlen. Die Grundlage für die Annahme eines genetischen Risikofaktors der HE wurde von Romero-Gómez et al. ⁴³ geschaffen. In ihrer Studie konnte eine Assoziation zwischen dem Vorliegen zweier „langer“ Allele im *GLS*-Mikrosatelliten mit dem Auftreten einer HE gezeigt werden. Romero-Gómez et al. ⁴³ verwendeten hochauflösende Schmelzkurvenanalysen zur Genotypisierung, wohingegen sämtliche Proben der vorliegenden Studie mittels Gelelektrophorese und Kapillarsequenzierung genotypisiert wurden. Demzufolge waren die genauen Definitionen der Allele nicht identisch. Bei der Unterteilung in Fälle und Kontrollen fallen weiterhin unterschiedliche Genotypenfrequenzen auf. In der spanischen Patientengruppe wiesen deutlich mehr Patienten die genetische Risikovariante auf. Grund hierfür könnte die abweichende Beurteilung der HE anhand der CFF-Werte bzw. der neuropsychologischen Symptome sein. In der

vorliegenden Studie wurde die HE unterhalb einer Frequenz von 39 Hz diagnostiziert, Romero-Gómez et al. ⁴³ setzten als Grenze 38 Hz fest. Trotz dieser Unterschiede konnte die Assoziation des *GLS*-Promotor-Polymorphismus mit der Entwicklung einer HE repliziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten damit die intestinale Glutaminase als HE-Risikogen.

Die in der multiplen Regressionsanalyse nachgewiesene zusätzliche Assoziation der HE mit der äthyltoxischen Genese der Leberzirrhose weist auf Gen-Umwelt-Interaktionen hin. Patienten mit chronischem Alkoholkonsum scheinen durch die genetische Risikovariante besonders gefährdet, eine HE zu entwickeln. Diese Ergebnisse könnten für eine individuelle Risikoabschätzung bei Zirrhosepatienten genutzt werden. Schwer zu behandelnde Patienten stellen eine Herausforderung an das ärztliche Team dar. Genetische Untersuchungen eröffnen die Chance, stratifizierte Therapiekonzepte zu entwickeln, die die Komplikationsraten senken und die Lebensqualität der Patienten verbessern könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen einen weiteren Schritt zur Klärung der Pathogenese der HE dar. Einige Fragen sind dennoch offen und erfordern zukünftige Studien. Ungeklärt ist bisher, wie die Glutamin-Synthetase bei einer Aktivitätserhöhung ihres enzymatischen Gegenspielers reguliert wird. Ob durch die genetischen Veränderungen der „langen“ *GLS*-Variante die Hemmung durch Glutamat aufgehoben wird, wurde bislang ebenfalls noch nicht untersucht. Auch für die Beantwortung der Frage, wie die erhöhte Glutaminaseaktivität am besten reduziert werden kann, sind weitere Untersuchungen nötig. Therapeutisch könnten Histidin, welches den Eintritt von Glutamin in Mitochondrien blockiert, oder 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin, das die Glutaminase als auch transmembranöse Glutamintransporter inhibiert ², eingesetzt werden.

Sowohl Leber als auch Darm sind an der Entgiftung des Körpers beteiligt, ihre Funktionen greifen ineinander. Für die Untersuchung der Zusammensetzung der Darmflora bietet sich die Bestimmung des Mikrobioms im Stuhl an. Bajaj et al. ⁶ berichteten, dass die Leberzirrhose, besonders beim Vorliegen einer HE, mit signifikant erhöhten Konzentrationen bestimmter Bakterienarten wie *Alcaligenaceae*, *Porphyromonadaceae* und *Enterobacteriaceae* im Dünndarm assoziiert ist.

Da die Glutaminase zu über 80% in Dünndarm-Enterozyten vorkommt, könnte die Gabe des nicht resorbierbaren Antibiotikums Rifaximin bei Trägern der Risikovariante die HE günstig beeinflussen, was im Einklang mit klinischen Ergebnissen von Bass et al. stünde ⁷. Verzweigt-kettige Aminosäuren erhöhen die Glutaminase-Aktivität ²⁹, deshalb sollten diese bei gefährdeten Patienten nur zurückhaltend eingesetzt werden. Für eine optimale Therapie der HE bleibt abzuwarten, inwieweit zukünftige Studien den komplexen Pathomechanismus und somit auch genetische Einflussfaktoren weiter entschlüsseln. So könnte die Kenntnis weiterer die HE fördernder Gene die Grundlage für neue Medikamente bilden.

6. Literaturverzeichnis

1. Albrecht J (2010), "Hepatic encephalopathy in our genes?" *Ann Intern Med*, 153:335-6.
2. Albrecht J, Norenberg MD (2006), "Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity". *Hepatology*, 44:788-94.
3. Als Nielsen B, Koretz RL, Kjaergard LL, Gluud C (2003), "Branched-chain amino acids for hepatic encephalopathy". *Cochrane Database Syst Rev*:Cd001939.
4. Amodio P, Del Piccolo F, Petteno E, Mapelli D, Angeli P, Lemmolo R, Muraca M, Musto C, Gerunda G, Rizzo C, Merkel C, Gatta A (2001), "Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients". *J Hepatol*, 35:37-45.
5. Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F (2010), "Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2*) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis". *Hepatology*, 51:1327-33.
6. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, Sikaroodi M, Gillevet PM (2012), "Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302:168-75.
7. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP (2010), "Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy". *N Engl J Med*, 362:1071-81.
8. Bernal W, Donaldson P, Underhill J, Wendon J, Williams R (1998), "Tumor necrosis factor genomic polymorphism and outcome of acetaminophen (paracetamol)-induced acute liver failure". *J Hepatol*, 29:53-9.
9. Bismuth M, Funakoshi N, Cadranel JF, Blanc P (2011), "Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to therapeutic management". *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23:8-22.
10. Boyer TD, Haskal ZJ (2005), "The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the management of portal hypertension". *Hepatology*, 41:386-400.

11. Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, Rodes J (1999), "Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis". *J Hepatol*, 30:890-5.
12. Campos J, Gude F, Quinteiro C, Vidal C, Gonzalez Quintela A (2006), "Gene by environment interaction: the -159C/T polymorphism in the promoter region of the *CD14* gene modifies the effect of alcohol consumption on serum IgE levels". *Alcohol Clin Exp Res*, 30:7-14.
13. Child CG, Turcotte JG (1964), "Surgery and portal hypertension". *Major Probl Clin Surg*, 1:1-85.
14. Cooper AJ, Plum F (1987), "Biochemistry and physiology of brain ammonia". *Physiol Rev*, 67:440-519.
15. Curthoys NP, Watford M (1995), "Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism". *Annu Rev Nutr*, 15:133-59.
16. D'Amico G, Garcia Tsao G, Pagliaro L (2006), "Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies". *J Hepatol*, 44:217-31.
17. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro L, Marubini E (1986), "Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis". *Dig Dis Sci*, 31:468-75.
18. Felipo V, Urios A, Montesinos E, Molina I, Garcia Torres ML, Civera M, Del Olmo JA, Ortega J, Martinez Valls J, Serra MA, Cassinello N, Wassel A, Jorda E, Montoliu C (2011), "Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy". *Metab Brain Dis*, 27:51-8.
19. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002), "Hepatic encephalopathy-definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998". *Hepatology*, 35:716-721.
20. Grüngreiff K, Grüngreiff S, Reinhold D (2000), "Zinc deficiency and hepatic encephalopathy: Results of a long-term follow-up on zinc supplementation". *J Trace Elem Exp Med*, 13:21-31.
21. Hartmann IJ, Groeneweg M, Quero JC, Beijeman SJ, de Man RA, Hop WC, Schalm SW (2000), "The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy". *Am J Gastroenterol*, 95:2029-34.

22. James LA, Lunn PG, Middleton S, Elia M (1998), "Distribution of glutaminase and glutamine synthetase activities in the human gastrointestinal tract". Clin Sci (Lond), 94:313-9.
23. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D (2002), "Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy". Hepatology, 35:357-66.
24. Laurretto MS, Nakano F, Faria SR, Jr., Pereira CA, Stern JM (2009), "A straightforward multiallelic significance test for the Hardy-Weinberg equilibrium law". Genet Mol Biol, 32:619-25.
25. Lockwood AH, Yap EW, Wong WH (1991), "Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy". J Cereb Blood Flow Metab, 11:337-41.
26. Matsuno T, Goto I (1992), "Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma". Cancer Res, 52:1192-4.
27. Matthews S (1922), "Ammonia, a causative factor in meat poisoning in Eck fistula dogs". AM J Physiol, 59:459-460.
28. Mayer L, Krawczyk M, Mahler M, Lang A, Grünhage F, Lammert F (2010), "In Search for genetic risk factors for hepatic encephalopathy: relevance of nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2*) variants". J Hepatol 54:74.
29. McCauley R, Kong SE, Heel K, Hall JC (1999), "The role of glutaminase in the small intestine". Int J Biochem Cell Biol, 31:405-13.
30. Miller KE, Balbas JC, Benton RL, Lam TS, Edwards KM, Kriebel RM, Schechter R (2011), "Glutaminase immunoreactivity and enzyme activity is increased in the rat dorsal root ganglion following peripheral inflammation". Pain Res Treat:414697.
31. Mock B, Kozak C, Seldin MF, Ruff N, D'Hoostelaere L, Szpirer C, Levan G, Seuanez H, O'Brien S, Banner C (1989), "A glutaminase (*gis*) gene maps to mouse chromosome 1, rat chromosome 9, and human chromosome 2". Genomics, 5:291-7.
32. Nencki M, Pawlow J, Zaleski J (1896), "On the content of ammonia in blood within organs and on formation of urea in mammals". Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol, 37:26-51.

33. Nolte W, Wiltfang J, Schindler C, Munke H, Unterberg K, Zumhasch U, Figulla HR, Werner G, Hartmann H, Ramadori G (1998), "Portosystemic hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt in patients with cirrhosis: clinical, laboratory, psychometric, and electroencephalographic investigations". *Hepatology*, 28:1215-25.
34. Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS (2007), "New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling". *Metab Brain Dis*, 22:219-34.
35. Olde Damink SW, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC, Deutz NE, Soeters PB (2002), "Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS". *Hepatology*, 36:1163-71.
36. Papatheodoridis GV, Goulis J, Leandro G, Patch D, Burroughs AK (1999), "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt compared with endoscopic treatment for prevention of variceal rebleeding: A meta-analysis". *Hepatology*, 30:612-22.
37. Phillips GB, Schwartz R, Gabuzda GJ, Jr., Davidson CS (1952), "The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances". *N Engl J Med*, 247:239-46.
38. Poordad FF (2007), "Review article: the burden of hepatic encephalopathy". *Aliment Pharmacol Ther*, 25:3-9.
39. Prakash R, Mullen K (2010), "Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy". *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7:515-25.
40. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, R W (1973), "Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices". *Br J Surg*, 60:646-49.
41. Riggio O, Nardelli S, Moscucci F, Pasquale C, Ridola L, Merli M (1996), "Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt". *Clin Liver Dis*, 16:133-46.
42. Romero Gomez M, Boza F, Garcia Valdecasas MS, Garcia E, Aguilar Reina J (2001), "Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy". *Am J Gastroenterol*, 96:2718-23.
43. Romero Gomez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galan JJ, Montoliu C, Baccaro E, Guevara M, Cordoba J, Soriano G, Navarro JM, Martinez Sierra C, Grande L, Galindo A, Mira E, Manes S, Ruiz A (2010), "Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the

- development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study". *Ann Intern Med*, 153:281-8.
44. Romero Gomez M, Ramos Guerrero R, Grande L, de Teran LC, Corpas R, Camacho I, Bautista JD (2004), "Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy". *J Hepatol*, 41:49-54.
 45. Schliess F, Gorg B, Häussinger D (2006), "Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm". *Biol Chem*, 387:1363-70.
 46. Schuppan D, Afdhal NH (2008), "Liver cirrhosis". *Lancet*, 371:838-51.
 47. Sharifi Y, Shah N, Jover M, Marsden D, Davies N, Scaravilli F, Jalan R (2012), "Evidence refuting the Trojan-Horse hypothesis of brain swelling in Acute Liver Failure: L-Type Glutaminase is exclusively neuronal". *J Hepatol*, 56:104.
 48. Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK (2007), "Critical flicker frequency: diagnostic tool for minimal hepatic encephalopathy". *J Hepatol*, 47:67-73.
 49. Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R (2004), "Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis". *J Hepatol*, 40:247-54.
 50. Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, Jalan R (2005), "Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same". *Metab Brain Dis*, 20:169-79.
 51. Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, Jalan R (2007), "Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy". *Metab Brain Dis*, 22:125-38.
 52. Sorensen M, Keiding S (2007), "New findings on cerebral ammonia uptake in HE using functional ¹³N-ammonia PET". *Metab Brain Dis*, 22:277-84.
 53. Talwalkar JA, Kamath PS (2005), "Influence of recent advances in medical management on clinical outcomes of cirrhosis". *Mayo Clin Proc*, 80:1501-8.
 54. Van Leeuwen PA, van Berlo CL, Soeters PB (1988), "New mode of action for lactulose". *Lancet*, 1:55-6.
 55. Weber FL, Veach GL (1979), "The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dog". *Gastroenterology*, 77:235-40.
 56. Wein C, Koch H, Popp B, Oehler G, Schauder P (2004), "Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive". *Hepatology*, 39:739-45.

57. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R, United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee (2003), "Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers". *Gastroenterology*, 124:91-6.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Klinische Einteilung der HE
- Tab. 2: Einteilung der HE nach CFF-Ergebnissen
- Tab. 3: Protokoll für die DNA-Isolierung
- Tab. 4: Übersicht des Pipettierschemas für die PCR
- Tab. 5: Übersicht des Pipettierschemas für die Sequenzierungs-PCR
- Tab. 6: Protokoll für die DNA-Aufreinigung
- Tab. 7: Laborchemische Daten der Zirrhosepatienten
- Tab. 8: *GLS*-Mikrosatelliten-Genotypisierung
- Tab. 9: Häufigkeiten der *GLS*-Genotypen bei Fällen und Kontrollen
- Tab. 10: Korrelationsanalyse der laborchemischen Parameter
- Tab. 11: Univariate Regressionsanalyse mit CFF als abhängige Variable und homozygot „langer“ Genotyp, MELD-Score und Natrium als unabhängige Variablen
- Tab. 12: Univariate Regressionsanalyse mit dem Vorliegen bzw. der Abwesenheit einer HE als abhängige Variable und den unabhängigen Variablen homozygot „langer“ Genotyp, Alter, Natrium und äthyltoxische Genese der Leberzirrhose
- Tab. 13: Multiple Regression für den CFF-Wert als abhängige Variable mit den unabhängigen Variablen homozygot „langer“ Genotyp und Natrium im Serum
- Tab. 14: Multiple Regression mit dem Auftreten einer HE als abhängige Variable und homozygot „langer“ Genotyp, äthyltoxische Genese der Leberzirrhose und Alter als unabhängige Variablen

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Pathogenesemodell und auslösende Faktoren der HE
- Abb. 2: Glutamindesaminierung mit Hilfe der Phosphat-aktivierten Glutaminase
- Abb. 3: Verlauf der Messwerte für die kritische Flimmerfrequenz in Abhängigkeit vom Schweregrad der HE
- Abb. 4: VNTR (GCA)_n und die flankierende Sequenz im *GLS*-Gen
- Abb. 5: Sequenzen der verwendeten Primer für den *GLS*-Mikrosatelliten-Nachweis
- Abb. 6: Altersverteilung der Kohorte nach Patientenanzahl
- Abb. 7: Ätiologie der Leberzirrhose
- Abb. 8: Verteilung der CFF-Ergebnisse (Hz) im Patientenkollektiv
- Abb. 9: Repräsentativer Gelausschnitt für die Auswertung der PCR
- Abb. 10: Häufigkeiten (%) der drei *GLS*-Genotypen im Patientenkollektiv
- Abb. 11: Gelelektrophorese
- Abb. 12: De Finetti-Diagramm mit den *GLS*-Allel- und Genotypenfrequenzen bei Fällen und Kontrollen
- Abb. 13: Darstellung der CFF-Mittelwerte in Abhängigkeit des Genotyps
- Abb. 14: Anzahl der Patienten mit und ohne HE in Abhängigkeit vom *GLS*-Genotyp
- Abb. 15: Anzahl der Patienten mit verschiedenen *GLS*-Genotypen in Abhängigkeit vom Schweregrad der HE
- Abb. 16: Vorkommen und Häufigkeit der Komplikation SBP in Abhängigkeit der *GLS*-Genotypen
- Abb. 17: Child-Pugh-Mittelwerte der Patienten mit verschiedenen *GLS*-Genotypen
- Abb. 18: Mittelwerte des MELD-Scores in Abhängigkeit des Genotyps
- Abb. 19: Korrelation der CFF-Werte (Hz) mit Ammoniak (µg/dl)
- Abb. 20: Korrelation der CFF-Werte (Hz) mit Serumalbumin (g/dl)
- Abb. 21: CFF-Mittelwerte von Patienten mit und ohne Hyponatriämie
- Abb. 22: Altersvergleich der Patienten mit und ohne HE
- Abb. 23: Patientenanzahl mit (blau) und ohne HE (grün) in Abhängigkeit der Genese der Leberzirrhose
- Abb. 24: CFF-Mittelwerte (Hz) bei Patienten ohne und mit TIPS

7.3 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
CFF	critical flicker frequency
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Exp (B)	Odds ratio
<i>GLS</i>	Glutaminase-Gen
HE	Hepatische Enzephalopathie
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
INR	international normalized ratio
KI	Konfidenzintervall
MELD	model for end-stage liver disease
mHE	Minimale hepatische Enzephalopathie
N	Anzahl
<i>NOD2</i>	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OR	Odds ratio
p	p-Wert
PCR	polymerase chain reaction
SBP	Spontane bakterielle Peritonitis
T	t-Wert
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Stent-Shunt
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VNTR	variable number tandem repeats
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg erstellt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Frank Lammert für die Überlassung des Themas sowie seine ausgezeichnete Betreuung. Zudem danke ich ihm für die Bereitschaft zur konstruktiven Kritik, seinen steten Anregungen sowie zahlreichen Ideen bei der Entstehung dieser Arbeit.

Bei Laborleiterin Dr. rer. nat. Susanne Weber und der gesamten Laborgruppe möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft sowie die Unterstützung bei der praktischen Einarbeitung im Labor bedanken.

Großer Dank gilt Reinhild Goebel für die Einweisung in die molekulargenetischen Arbeitstechniken und konstante Hilfestellungen bei den Versuchen im Labor.

Ich danke Armin Lang für die Unterstützung bei der Durchführung der Flimmerfrequenzanalysen und Miriam Langhirt für ihre Hilfe bei der Kapillarsequenzierung.

Bei den Dipl.-Biologinnen Katrin Hochrath und Rabea Hall bedanke ich mich für die Tipps zur statistischen Analyse sowie bei Dr. med. Marcin Krawczyk für seine Ratschläge beim Erstellen der Abstracts.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir mein Studium und damit auch diese Dissertation ermöglicht haben und die es verstanden haben, mich immer wieder neu zu motivieren.

9. Curriculum vitae

Eigene Veröffentlichungen und Posterpräsentationen

European Association for the Study of the Liver, Berlin, 2011

Mayer L, Krawczyk M, Mahler M, Lang A, Grünhage F, Lammert F (2010), „In search for genetic risk factors for hepatic encephalopathy: relevance of nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2*) variants”. *J Hepatol*, 54:74

Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Leipzig, 2011

Mayer L, Krawczyk M, Mahler M, Lang A, Grünhage F, Lammert F (2011), „Bedeutung von nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2*) Varianten für die Entwicklung einer HE“. *J Gastroenterol*, 49:1169

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 2012

Mayer L, Grünhage F, Lammert F (2012), “A genetic variant in the promoter of phosphate activated glutaminase (*GLS*) gene predicts the risk of developing hepatic encephalopathy”. *Internist*, 13:16