

Aus der Klinik für Innere Medizin II

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Frank Lammert

# **Hepatopathie bei COVID-19 in Abhängigkeit von Risikofaktoren**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2021**

vorgelegt von: Antonia Rosina Machill

geb. am: 11. Juni 1997 in Bergisch Gladbach

Tag der Promotion: 7. März 2022

Dekan: Universitäts-Professor Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Universitäts-Professor Dr. med. Frank Lammert

2. Berichterstatter: Universitäts-Professorin Dr. med. Sigrun Smola

*meinen Eltern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
1.1	Hepatopathie bei COVID-19 in Abhängigkeit von Risikofaktoren .....	1
1.2	Hepatopathy in COVID-19 depending on risk factors .....	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	SARS-CoV-2 .....	3
2.2	Leberbeteiligung bei COVID-19 .....	8
2.2.1	Symptomatik .....	8
2.2.2	Ursachen .....	10
2.3	Genetische Risikofaktoren für Lebererkrankungen.....	13
2.4	Zielsetzungen.....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>22</b>
3.1	Studiendesign.....	22
3.2	Listung der SNPs .....	24
3.3	Molekulargenetische Analysen.....	25
3.3.1	DNA-Isolierung .....	26
3.3.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	27
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.3.4	Allelische Diskriminierung.....	28
3.3.5	Sanger-Sequenzierung .....	33
3.4	Statistische Analysen .....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>

4.1	Patientencharakteristika .....	41
4.2	Leberparameter .....	44
4.2.1	Leberparameter im Verlauf (Loess-Regressionsgraphen) .....	48
4.2.2	Analyse differenzialdiagnostischer Quotienten .....	56
4.2.3	Korrelation der Leberparameter mit Charakteristika und Outcome .....	62
4.2.4	Korrelation Leberparameter und Entzündungsmarker: Ist Zellschädigung auf Leber begrenzt oder systemisch? .....	69
4.3	Vitamin D-Status .....	73
4.4	Genotypisierung.....	75
4.4.1	Ergebnisse der allelischen Diskriminierung .....	75
4.4.2	Prüfung der Genotypen auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium.....	78
4.4.3	Korrelationen des <i>MBOAT7</i> -Risikoallels mit Outcome und Leberparametern .....	81
4.4.4	Kombinierte Analyse der SNPs im <i>MBOAT7</i> -, <i>PNPLA3</i> - und <i>TM6SF2</i> - Gen.....	92
4.5	AB0-Blutgruppenbestimmung.....	95
4.5.1	Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung.....	95
4.5.2	Korrelation zwischen Blutgruppen und Leberparametern.....	96
4.5.3	Korrelation zwischen Blutgruppen und Outcome.....	103
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
5.1	Leberbeteiligung bei COVID-19 .....	104
5.2	Risikofaktoren einer Hepatopathie während COVID-19 .....	109
5.2.1	Vitamin D-Status .....	110
5.2.2	Präsenz von Allelvarianten .....	111
5.2.3	AB0-Blutgruppenstatus.....	112

5.3	Stärken der Studie.....	114
5.4	Limitationen der Studie .....	115
5.5	Ausblick.....	116
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>118</b>
6.1	Tabellenverzeichnis .....	118
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	120
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	123
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>141</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>142</b>

## 1 Zusammenfassung und Abstract

### 1.1 Hepatopathie bei COVID-19 in Abhängigkeit von Risikofaktoren

Seit Dezember 2019 ist das neuartige, pandemische Coronavirus SARS-CoV-2 als Auslöser der Krankheit COVID-19 bekannt, die sich initial mit respiratorischen Symptomen präsentiert. Bei einer Minderheit infizierter Personen führt sie zur Entwicklung eines akuten Atemnotsyndroms, das die Hauptursache des Versterbens von COVID-19-Patienten darstellt. Aufgrund von multiplen extrapulmonalen Manifestationsorten lässt sich auf eine systemische Infektion schließen, deren Symptome und Verlauf stark variieren [105]. Eine Hepatopathie tritt häufig bei COVID-19-Patienten auf und ist meist von milder Natur, sodass ein Großteil der Infizierten vollständig genesen kann [96]. Sie ist jedoch häufiger bei schwer verlaufenden Fällen, deren Ursache bis dato nicht gefunden werden konnte [22,45,71]. Die Variabilität des Krankheitsverlaufs gibt Grund zur Annahme, dass dieser von Eigenschaften des infizierten Menschen determiniert sein kann. Etablierte Risikofaktoren sind u.a. erhöhtes Alter, männliches Geschlecht, erhöhter BMI und kardio-pulmonale Vorerkrankungen [140].

Das Ziel dieser Arbeit ist, ein genaueres Verständnis der Leberbeteiligung bei Patienten mit einer SARS-CoV-2-Infektion zu erlangen und mögliche Faktoren zu finden, die zu einem höheren Risiko einer Leberbeteiligung und/oder einem letalen Verlauf führen können. Bei 61 Patienten mit einer SARS-CoV-2-Infektion wurden Korrelationen zwischen dem zeitlichen Verlauf laborchemischer Leberparameter, dem klinischen Outcome und Einzelnukleotid-Polymorphismen bestimmter Gene geprüft. Das Outcome wurde definiert als Notwendigkeit intensivmedizinischer Behandlung bei COVID-19-Pneumonie, invasiver Beatmung, ECMO-Therapie und Tod. Die molekulargenetischen Analysen mittels Allelischer Diskriminierung oder Sanger-Sequenzierung fokussierten auf die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen, die zu einem  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Mangel, einer Steatose oder einem Vitamin-D-Mangel führen können oder eine AB0-Blutgruppe definieren. 72% der Patienten zeigten bei Aufnahme und 85% im Gesamtverlauf ihres jeweiligen Krankenhausaufenthaltes mindestens einen pathologischen Leberparameter, der mit den dokumentierten Entzündungsmarkern CRP, LDH und IL-6 korreliert. Die Hypothese, dass sich Leberparameter und das Outcome bei Vorliegen der Risikofaktoren oder bei Zugehörigkeit einer Blutgruppe des AB0-Systems verschlechtern, konnte bei Vorliegen eines Vitamin D-Mangels, des *MBOAT7*-Risikoallels rs641738 und der Blutgruppe A statistisch signifikant bestätigt werden. Patienten mit einem Vitamin D-Mangel während ihres Krankenhausaufenthaltes wiesen höhere  $\gamma$ -GT- und CRP-Konzentrationen auf, während Träger des *MBOAT7*-Risikoallels erhöhte Werte von ALT, AP,  $\gamma$ -GT und Bilirubin sowie erniedrigte Albumin-Konzentrationen im Serum präsentierten. Außerdem konnte ein signifikanter Anstieg der Maximalwerte der Cholestasemarker  $\gamma$ -GT und AP mit der summierten Anzahl der Steatose-Risikoallele *MBOAT7*, *PNPLA3* und *TM6SF2* beobachtet werden. Bei Patienten mit Blut-

gruppe A waren die Konzentrationen der Surrogatmarker für Leberschädigung und systemische Entzündung erhöht. Mit diesem Wissen könnten Prognosemarker bei Aufnahme als auch im Krankheitsverlauf etabliert werden, um eine mögliche dauerhafte Leberschädigung nicht zu übersehen.

### 1.2 Hepatopathy in COVID-19 depending on risk factors

Since December 2019, the novel pandemic coronavirus SARS-CoV-2 has been known to cause COVID-19 disease, which initially presents with respiratory symptoms. In a minority of infected individuals, it leads to the development of acute respiratory distress syndrome, which is the leading cause of death in COVID-19 patients. Multiple extrapulmonary sites of manifestation suggest a systemic infection, of which the symptoms and course vary widely [105]. Hepatopathy is common in COVID-19 patients and is usually mild, allowing a large proportion of infected individuals to recover completely [96]. However, it is more common in severe cases, the cause of which has not yet been found [22,45,71]. The variability of the development of the disease gives reason to believe that it may be determined by characteristics of the infected person. Established risk factors include increased age, male gender, increased BMI and previous cardio-pulmonary disease [140].

The aim of this work is to gain a more detailed understanding of liver involvement in patients with SARS-CoV-2 infection and to find possible factors that may lead to a higher risk of liver involvement and/or a lethal course. In 61 patients with SARS-CoV-2 infection, correlations between the time course of laboratory liver parameters, clinical outcome and single nucleotide polymorphisms of specific genes were tested. Outcome was defined as the need for intensive care treatment for COVID-19 pneumonia, invasive ventilation, ECMO therapy and death. Molecular genetic analyses by allelic discrimination or Sanger-sequencing focused on the detection of single nucleotide polymorphisms that may lead to  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency, steatosis or vitamin D deficiency, or define an AB0 blood group. 72% of the patients showed at least one pathological liver parameter on admission and 85% in the overall course of their hospital stay, which correlate with the documented inflammatory markers CRP, LDH and IL-6. The hypothesis that liver parameters and outcome are worsened in the presence of risk factors or if a blood group of the AB0 system is present, could be statistically significantly confirmed in the presence of vitamin D deficiency, the *MBOAT7* risk allele rs641738 and the blood group A. Patients with vitamin D deficiency during their hospital stay had higher  $\gamma$ -GT and CRP concentrations, while carriers of the *MBOAT7* risk allele presented increased levels of ALT, AP,  $\gamma$ -GT and bilirubin as well as decreased serum albumin concentrations. In addition, a significant increase in the maximum values of the cholestasis markers  $\gamma$ -GT and AP was observed with the summed number of the steatosis risk alleles *MBOAT7*, *PNPLA3* and *TM6SF2*. In patients with blood group A, the concentrations of surrogate markers of liver injury and systemic inflammation were elevated. With this knowledge, prognostic markers could be established on admission as well as in the course of the disease in order not to overlook possible permanent liver damage.

## 2 Einleitung

### 2.1 SARS-CoV-2

Coronaviren sind behüllte Ribonukleinsäure (RNA)-Viren der Virusfamilie *Coronaviridae*, die erstmals im Jahre 1967 beschrieben wurden. Unter dem Elektronenmikroskop ist Virologen ein charakteristischer Kranz aufgefallen, der das Virus umgibt und an eine Sonnenkorona denken lässt, was dem neu entdeckten Virus seinen Namen gab (lat. *corona* „Kranz, Krone“) [150]. Die Familie umfasst neben einer Vielzahl an Spezies, die nur bei Tieren Krankheiten auslösen, sieben humanpathogene Coronaviren. Auslöser von hauptsächlich milden Infektionen der oberen Atemwege und seit den 1960er Jahren weltweit verbreitet sind die folgenden vier endemischen Viren: HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 und HCoV-HKU1. Zusätzlich wurden in den letzten zwei Jahrzehnten drei weitere Viren entdeckt, die ursprünglich von Tieren auf den Menschen übertragen wurden und schwere virale Pneumonien auslösen können [28].

Das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) war Auslöser der ersten Pandemie des 21. Jahrhunderts. Ausgehend von China breitete es sich im November 2002 in 25 Ländern auf allen Kontinenten aus und führte zum Schweren Akuten Atemwegssyndrom (SARS) mit der klinischen Manifestation einer Pneumonie, woran etwa 8000 Menschen erkrankten und 774 verstarben [152]. Als natürliches Reservoir konnten Fledermausarten der Familie der Hufeisennasen (*Rhinolophidae*) identifiziert werden, von denen das Virus über Zwischenwirte wie Schleichkatzen und Marderhunde auf den Menschen übertragen wurde. Der Ausbruch des Virus wurde schließlich durch Mensch-zu-Mensch-Infektionsketten und durch globale Reisetätigkeit von Infizierten getriggert. Der Verlauf einer SARS-Infektion verläuft zumeist gravierender als eine Infektion mit den endemischen Coronaviren. Häufig kommt es zu einer Pneumonie mit Fieber, Husten und Atemnot, die sich bis zum akuten Lungenversagen und Tod entwickeln kann. Das zweite zoonotische humanpathogene Coronavirus ist das Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), das im April 2012 bei Patienten auf der arabischen Halbinsel nachgewiesen wurde und woher die bis dato meisten der 2400 laborbestätigten Fälle stammen. Die Symptome sind ähnlich einer SARS-Infektion und die Krankheit verläuft ebenfalls gravierender als die der endemischen Viren. Bis heute konnten keine antiviralen Medikamente entwickelt werden, um die hochpathogenen Coronaviren zu bekämpfen [52]. Die letztgenannten hochpathogenen Coronaviren wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) der Liste der „priority diseases“ hinzugefügt, die ein großes Gesundheitsrisiko für die Weltbevölkerung darstellen und das Potential haben, einen weltweiten Krankheitsausbruch auszulösen [138].

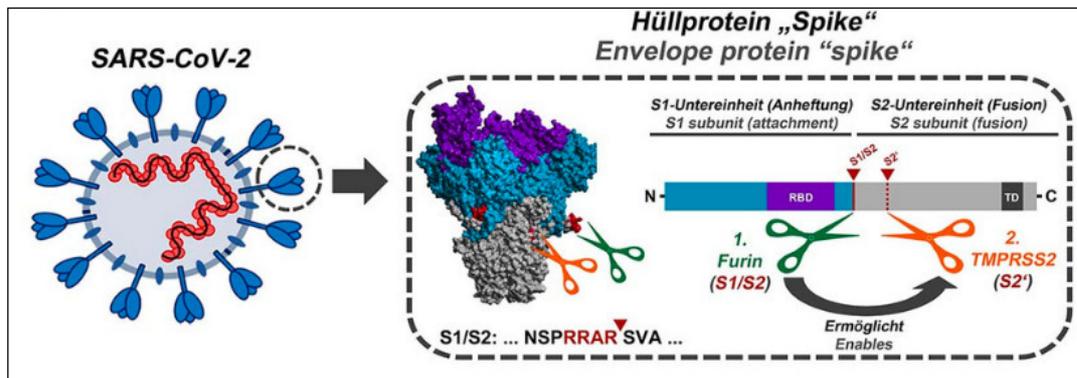
Die zweite Pandemie des 21. Jahrhunderts ist einem weiteren Coronavirus geschuldet. Im Dezember 2019 kam es in der chinesischen Stadt Wuhan zu einem Ausbruch von Pneumonien unklarer Genese, deren Ursache Anfang Januar 2020 in dem neuartigen Coronavirus (2019-nCoV) gefunden wurde. Das

amerikanische Ärzteblatt *Journal of the American Medical Association* (JAMA) veröffentlichte Februar 2020 eine der ersten Studien aus Wuhan, die von einer sehr schnellen Mensch-zu-Mensch-Übertragung und der höchst infektiösen Eigenschaft des Virus berichtete [124]. Die Krankheit, Coronavirus Disease 19 (COVID-19) genannt, breitete sich innerhalb weniger Wochen rasant zuerst verstärkt in China und seinen Nachbarländern und schließlich über die ganze Welt aus. Aufgrund seiner engen Verwandtschaft zum SARS-CoV wurde sein Name zu Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) geändert. Am 11. März 2020 wurde COVID-19 von der WHO, aufgrund des nicht abflauenden Anstiegs an Infektionszahlen, die in 113 Ländern lokalisiert wurden, als Pandemie betitelt. Zu dem Zeitpunkt gab es insgesamt über 110.000 bestätigte Infektionen und über 4.200 Todesfälle [139]. Die Basisreproduktionszahl ( $R_0$ ) des SARS-CoV-2 liegt zwischen 2,4 und 3,3, was bedeutet, dass durchschnittlich ein Infizierter zwei bis drei weitere Personen anstecken kann, da eine fehlende Grundimmunität der Bevölkerungen und noch keine Infektionsschutzmaßnahmen vorliegen [140]. Gesundheitssysteme von Entwicklungsländern und Industrienationen wurden überlastet, weil es in einem kurzen Zeitraum zu einer hohen Zahl an Infizierten und behandlungsbedürftigen Patienten kam. Länder entwickelten strenge Ausgangs- und Kontaktbeschränkungen und Verpflichtungen zu Hygienemaßnahmen, um die Reproduktionszahl niedrig zu halten. Im Journal *The Lancet* wurde eine Studie veröffentlicht, dass das Tragen von Masken und Einhalten eines Abstands zu Mitmenschen von über einem Meter vor einer Übertragung des Virus schütze, sodass diese Regeln in der Öffentlichkeit in großen Teilen der Industrienationen, darunter Deutschland, bis jetzt obligatorisch einzuhalten sind [25]. Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit wurden mehr als 143 Millionen Fälle und davon über drei Millionen Todesfälle weltweit der WHO gemeldet. Deutschland verzeichnete über 3 Millionen Infektionsfälle, von denen über 80.000 Menschen verstorben sind [141].

### **Pathophysiologie**

Das Genom des SARS-CoV-2 ähnelt dem von SARS-CoV zu 82% [22]. Beide Viren benutzen das Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2) als Rezeptor, um in die Wirtszelle einzudringen. Ermöglicht wird dies durch das Spike-Protein auf der Virusoberfläche, welches die Bindung an ACE2 auf der Wirtszelle vermittelt, um die Erbinformation für die virale Vermehrung in die Wirtszellen einschleusen zu können. Das Spike-Protein besteht aus zwei Untereinheiten: Die oberflächliche Einheit S1 vermittelt die Anheftung an die Zelle, während die transmembrane Einheit S2 die Fusion mit der Zelle ermöglicht. Um eine Bindung eingehen zu können, muss das Spike-Protein in einem Zwei-Schritt-Prozess aktiviert werden, indem Aktivierungssequenzen durch Proteasen gespalten werden. Hoffmann et al. [53] konnten zeigen, dass SARS-CoV-2 eine Aktivierungssequenz an der S1/S2-Spaltstelle des Spike-Proteins trägt, die bisher nicht in SARS-CoV gefunden werden konnte. Im ersten Schritt wird diese Sequenz durch die Protease Furin gespalten, was zu einer Bindung des Spike-Proteins an den Rezeptor ACE2 auf der Zielzelle führt. Darüber hinaus ermöglicht die Spaltung die Bildung eines zellulären Synzytiums, das heißt

eine Verschmelzung von infizierten Zellen mit nicht-infizierten Zellen des Wirts. Dies ist eine potente Methode des Virus, sich im menschlichen Körper zu vermehren, ohne die Zelle zu verlassen. Im zweiten Schritt wird die Aktivierungssequenz S2' der Untereinheit S2' durch die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) gespalten, was zu einer Membranfusion zwischen Virus und Zielzelle führt [52]. Abbildung 1 demonstriert das Spike-Protein in seinen Untereinheiten und Aktivierungssequenzen.

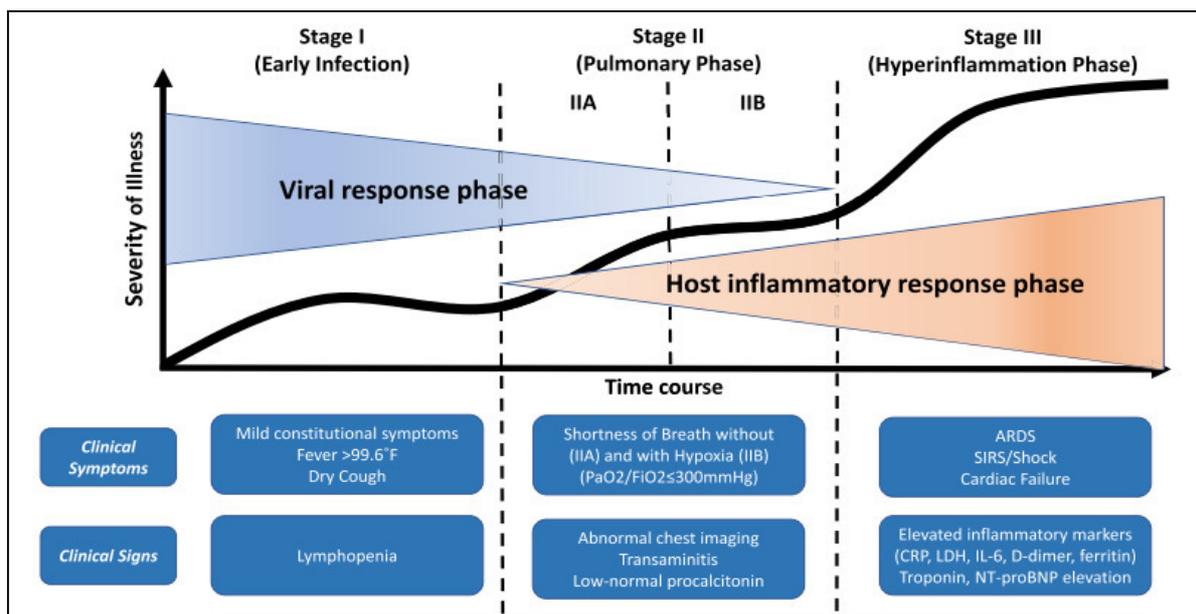


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des SARS-CoV-2, des viralen Spike-Proteins und der Spaltstellen für Furin (grün, S1/S2-Position) und TMPRSS2 (orange, S2'-Position) [52]

ACE2 wird von Alveolarzellen des Typs 2 in der Lunge (AT2), aber auch von Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (Kolon, Ileum, Rektum, Magen, Ösophagus), von Gefäßendothelzellen, von Tubuluszellen der Niere sowie von Hepatozyten und Cholangiozyten exprimiert [90]. Übertragen werden die Viren hauptsächlich durch respiratorische Aufnahme von Tröpfchen ( $>5\mu\text{m}$ ) und Aerosolen ( $<5\mu\text{m}$ ). Infizierte sind ansteckend ein bis zwei Tage bevor, während und nachdem sie Symptome zeigen und sogar im Rahmen eines vollständig asymptomatischen Verlaufs. Die Zeitspanne der höchsten Kontagiosität ist die Zeit vor oder zum Symptombeginn, wobei sie im weiteren Verlauf von durchschnittlich sieben Tagen ähnlich der Viruslast stetig abnimmt [50]. Die Diagnostik erfolgt durch den direkten Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase-chain reaction*, PCR) von Rachenabstrichen bzw. Nasopharyngealabstrichen oder im weiteren Verlauf von Sekreten der unteren Atemwege. Möglich ist ebenfalls der indirekte Nachweis durch Testen auf SARS-CoV-2-spezifische Antikörper im Serum (IgM, IgA, IgG), die etwa ein bis zwei Wochen nach Beginn der Symptomatik detektierbar sind [142]. Obgleich die Datenlage bezüglich Vorerkrankungen noch mangelhaft ist, konnten bereits folgende zugrundeliegende Erkrankungen als Risikofaktoren eingestuft werden: Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathie), Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas (BMI  $>30$ ), COPD, chronische Niereninsuffizienz und Immunsuppression nach Organtransplantationen oder Krebsleiden [143]. Unabhängig davon gelten höheres Alter ( $>60$  Jahre), das männliche Geschlecht und die Blutgruppe A des AB0-Blutgruppensystems als weitere wichtige Eigenschaften, die eine schwere Infektion mit SARS-CoV-2 wahrscheinlicher machen [32,127].

## Symptome

Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich fünf bis sechs Tage und die Symptome variieren stark in ihrem Auftreten. Berichtet wird von trockenem Husten, Fieber, Schnupfen, Halsschmerzen, Dyspnoe, Kopf- und Gliederschmerzen, Störung des Geruchs-und/oder Geschmackssinns, Myalgien, Übelkeit, Durchfall, Leberfunktionsstörungen über Pneumonie zu einem schweren akuten Atemnotsyndrom (ARDS) mit letalem Ausgang. Ein erster Vorschlag zur Klassifikation teilt den Krankheitsverlauf in drei chronologische Phasen ein: 1. Frühe Infektion, 2. pulmonale Phase, 3. hyperinflammatorische Phase (Abbildung 2) [105].



**Abbildung 2:** Schematischer Krankheitsverlauf COVID-19

Phase 1 ist gekennzeichnet durch milde respiratorische und systemische Symptome wie Abgeschlagenheit, trockenem Husten, Schnupfen und Fieber, die durchschnittlich zwei bis 14 Tage nach Virusexposition auftreten können [144]. Die Prognose für das Outcome der frühen Infektion ist sehr gut und es hat sich gezeigt, dass 81% aller Patienten nach einem milden Krankheitsverlauf vollständig genesen [128]. Erwähnenswert ist außerdem, dass mehrere Studien bei über der Hälfte der Patienten im frühen Stadium olfaktorische und gustatorische Dysfunktionen aufwiesen, häufig als einziges Initialsymptom [116].

In Phase 2 kommt es zu einer lokalen Inflammation der Lunge und Patienten entwickeln eine virale Pneumonie mit Husten, Fieber und Atemnot. Hinweis auf einen beginnenden schweren Verlauf mit Hypoxie ist ein < 300 mmHg erniedrigter Horowitz-Quotient (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>). Aufgrund dessen wird Phase 2 in 2a (ohne Hypoxie) und 2b (mit Hypoxie) unterteilt. Röntgen- und computertomographische Aufnahmen (CT) des Thorax zeigen beidseitige diffuse Verschattungen oder Milchglasinfiltrate. Letztere sind Areale im Lungenparenchym, die eine leicht angehobene Lungendichte aufweisen, da dort

Luft partiell von Ödemen, Exsudat oder Hämorrhagie aus dem Parenchym verdrängt wird. Laborwerte zeigen eine Lymphopenie und einen Transaminasenanstieg, während Entzündungsmarker leicht erhöht sein können. Procalcitoninwerte sind in den meisten Fällen einer COVID-19-Pneumonie niedrig bis normal. Rund 14% der COVID-19-Fälle entwickeln sich zu diesem schweren Verlauf, der oft eine invasive Beatmung notwendig macht.

Phase 3 manifestiert sich als eine systemische Hyperinflammation mit Vasoplegie, Schock, Multiorganversagen und ARDS, das mit einer Prävalenz von 17-29% bei COVID-19-Fällen auftritt [14]. Sie kann mit Herzinsuffizienz, Myokarditis, Herzrhythmusstörungen, venösen thromboembolischen Ereignissen und hypoxischer Enzephalopathie assoziiert werden. Darüber hinaus werden dialysepflichtiges Nierenversagen und gastrointestinale Symptome mit Leberfunktionsstörungen beobachtet, welche im Zentrum des Interesses dieser Arbeit stehen und im nächsten Abschnitt näher erläutert werden [142]. Inflammatorische Zytokine und Biomarker wie Interleukin (IL)-2, IL-6, IL-7, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), CC-Chemoligand 2 (CCL2/ *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1)), makrophagisches inflammatorisches Protein 1 $\alpha$  (MIP1 $\alpha$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), C-reaktives Protein (CRP), Ferritin und D-Dimere sind während der kritischen Phase stark erhöht, was als „Zytokinsturm“ bezeichnet wird. Ebenfalls ansteigend sind die Werte von Troponin und N-terminales pro-natriuretisches Peptid Typ B (NTproBNP). Das Krankheitsbild des Zytokinsturms entspricht dem einer sekundären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (SHL), ein reaktives Hyperinflammationssyndrom mit Hyperzytokinämie, Multiorganversagen und pulmonaler Beteiligung, das hauptsächlich durch virale Infektionen getriggert wird [77]. Signifikant erniedrigt sind jedoch Lymphozyten, darunter T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen, wie auch die Anteile von Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten [91]. Im Mittel haben 5% der Infizierten solch einen kritischen Verlauf, der intensivmedizinische Betreuung und teilweise eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) erforderlich macht [128]. Die Prognose für eine vollständige Genesung ist schlecht und noch können keine sicheren Aussagen über eventuelle Langzeitschäden von COVID-19 getroffen werden. Der Fall-Verstorbenen-Anteil (engl. *case fatality rate*, CFR) ist international zwischen einzelnen Ländern verschieden und hängt außerdem stark vom Alter der Infizierten ab. In Deutschland liegt er zur Zeit (bis November 2020) bei unter 0,1% für Erkrankte unter 50 Jahren, hingegen bei über 10% bei Personen über 80 Jahre [142].

## 2.2 Leberbeteiligung bei COVID-19

### 2.2.1 Symptomatik

ACE2 ist zu großen Teilen auf Enterozyten und in der Leber exprimiert, weswegen SARS-CoV-2 direkt die Zellen des Gastrointestinaltrakts befallen kann. Dies ist eine mögliche Ursache für die mit COVID-19 einhergehenden gastrointestinalen Symptome, die Appetitverlust, Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen und abdominale Schmerzen umfassen. Die Häufigkeit einer extrapulmonalen Symptomatik variiert jedoch stark nach Region; eine Metaanalyse chinesischer Studien beschreibt bei etwa 10% der Patienten die oben genannten Symptome [113], während in einer multizentrischen Studie aus Massachusetts über 60% der Patienten von mindestens einem der Symptome berichten und sie bei 14% sogar das Initialsymptom darstellen [93]. Von den ersten 50 deutschen Patienten der Uniklinik Aachen gaben 18% gastrointestinale Beschwerden an [31].

ACE2-Rezeptoren in der Leber befinden sich hauptsächlich auf Cholangiozyten und weniger häufig auf Hepatozyten, hingegen nicht auf Kupffer-Zellen, den leberspezifischen Makrophagen [90]. Klinisch manifestiert sich eine Leberbeteiligung mit erhöhten Leberwerten, jedoch weniger mit dem Auftreten gastrointestinaler Beschwerden, worauf die Ergebnisse einer amerikanischen multizentrischen Studie hinweisen. Berücksichtigt werden muss die kleine Kohortengröße und die geringe Datenlage, sodass noch keine generellen Aussagen diesbezüglich getroffen werden können [93].

Leberwerte werden in drei Unterklassen eingeteilt, die Hinweise auf die Art der Lebererkrankung geben. Parameter der Leberzellschädigung sind die zwei Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST), die Glutamatdehydrogenase (GLDH) und die Lactatdehydrogenase (LDH). Diese Enzyme werden bei Schädigung der Hepatozyten frei und gelangen in den Blutkreislauf. ALT und GLDH sind leberzellspezifisch, während AST auch im Herz, im Skelettmuskel und in Erythrozyten vorkommt. AST und ALT kommen im Leberzellzytoplasma vor, AST zusätzlich in den Mitochondrien, welche nur bei schwerer Leberschädigung mitbetroffen sind. LDH kommt in allen Körperzellen vor und am häufigsten treten erhöhte Werte bei Erkrankungen der Leber, der Skelettmuskulatur und bei Kardiomyopathien auf. Unter Cholestaseparametern werden  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin (Bilirubin gesamt; engl. *total bilirubin*, TBIL) verstanden, die auf eine Störung der Gallenbildung oder Gallensekretion hinweisen können. AP stammt zu gleichen Teilen aus Leber und Knochen. Syntheseparameter der Leber sind das Plasmaprotein Albumin, die Cholinesterase und weitere Plasmaproteine, die als Gerinnungsfaktoren wirken und die bei Untergang von Hepatozyten vermindert synthetisiert werden. Albumin zählt außerdem zu den Anti-Akute-Phase-Proteinen, sodass sein erniedrigter Wert im Serum auch auf einen Entzündungsvorgang im Körper hinweisen kann [6].

Die Inzidenz erhöhter Leberwerte bei hospitalisierten Patienten mit COVID-19 variiert zwischen Anteilen von 14% bis 76% je nach Studie [20,35,95,102,107]. Eine Leberschädigung präsentiert sich nach aktuellem Stand zumeist mild und kurzzeitig, ist jedoch vorherrschend bei schwer verlaufenden Fällen von COVID-19. Patienten mit progredienter Erkrankung zeigen häufiger ein größeres Ausmaß an Leberbeteiligung und vice versa sind pathologische Leberwerte mit dem Risiko verbunden, ein kritisches Stadium von COVID-19 zu erreichen [22,45,71].

Zu Beginn der Erkrankung steigen AST und ALT häufig auf das Ein- bis Zweifache des oberen Grenzwerts (engl. *upper limit of normal*, ULN), während TBIL normal bis moderat erhöht sein kann [87,94,95]. Erhöhte AST, ALT sowie TBIL-Werte konnten mit erhöhter Mortalität assoziiert werden [38,101].  $\gamma$ -GT als Cholestasemarker ist erhöht bei 16-19% der Patienten und wird mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert [20,101,103]. Der zweite Cholestasemarker AP ist bei einem kleineren Anteil der Patienten erhöht (5-12%) und korreliert ebenfalls mit dem Schweregrad der Erkrankung [20,38,101,103]. Die Albuminkonzentrationen sind bei Patienten mit schwerer Leberschädigung signifikant erniedrigt, und diese Patienten haben bei niedrigen Werten am Aufnahmetag bzw. zu Beginn der Erkrankung ein höheres Risiko, einen schweren COVID-19-Verlauf zu erleiden [87]. Sie treten bei 38% bis 98% aller Patienten auf und sind mit höherer Mortalität assoziiert [101].

Guan et al. [46] berichteten von erhöhten AST-Werten bei 22,2%, erhöhten ALT-Werten bei 21,3% und erhöhtem TBIL bei 10,5% der 1.099 chinesischen Patienten. Alle Werte sind bei schweren Krankheitsverläufen häufiger erhöht, besonders groß ist der Unterschied der AST-Erhöhung bei 39,4% der gravierenden Fälle im Gegensatz zu lediglich 18,4% der leichteren Fälle. Eine größere Kohorte von 5.700 hospitalisierten Patienten in New York beschrieb eine erhöhte AST von  $> 40$  U/l bei 58% und eine erhöhte ALT von  $> 60$  U/l bei 39%. In derselben Kohorte entwickelten 2% ein akutes Leberversagen mit Werten von AST und ALT  $> 1,5x$  ULN [95]. Eine Studie mit ähnlicher Kohortengröße wie der unseren berichtete über 60 Patienten des Massachusetts General Hospital, von denen 69% mindestens einen pathologischen Leberwert bei Aufnahme hatten. Durchschnittlich war die AST zu Beginn und während der Hospitalisierung höher als die ALT und signifikant mit der ALT assoziiert. Da AST nicht leberspezifisch ist und ebenso auf eine Myositis hinweisen kann, wurde auf eine Assoziation von AST mit Entzündungsmarkern und Muskelschädigungsmarkern geprüft. Interessanterweise korrelierte AST nicht mit Kreatinkinase und LDH (Marker einer Muskelschädigung) und moderat mit Entzündungsmarkern wie CRP und Ferritin. Dies deutet auf eine Leberzellschädigung mit möglicher mitochondrialer Beteiligung hin [17]. Dem widersprechen allerdings andere Studien mit der Aussage, dass eine schwere Leberschädigung mit Entzündungsmarkern wie Ferritin, Procalcitonin und IL-6 assoziiert sei. Außerdem sei die AST normalerweise höher als die ALT und könne als Mortalitätsprädiktor gesehen werden, was eher auf eine immunvermittelte Entzündung hinweise [38,87]. Eine Verlaufsstudie von Schattenberg et al. [103] aus Deutschland beschreibt, dass bei 75% der hospitalisierten Patienten ein Anstieg der

Leberfunktionswerte während ihres Krankenhausaufenthaltes zu beobachten war. Die AST war dominant erhöht und blieb länger und häufiger als die ALT über ULN. Die Cholestaseparameter waren indes weniger häufig erhöht, und es lagen keine Zeichen eines Leberversagens vor.

### 2.2.2 Ursachen

Der direkte Befall der Hepatozyten durch SARS-CoV-2 kann in dem Vorhandensein des Zelleintrittsrezeptors ACE2 auf Hepatozyten und Cholangiozyten begründet sein, welcher in größerer Dichte auf Cholangiozyten zu finden ist [90]. Cholangiozyten spielen als Reservoir für Leberstammzellen bei der Leberregeneration und pro-inflammatorischen Prozessen durch autokrine und parakrine Mechanismen eine wichtige Rolle [10]. Werden diese geschädigt, hat es wiederum einen zytopathischen Effekt auf die Hepatozyten und die Regenerationsfähigkeit nimmt ab [103]. Andererseits wurden SARS-CoV-2-Partikel im Zytoplasma der Hepatozyten gefunden und tragen auch dort eine Hülle mit den charakteristischen Spike-Proteinen. Dies spricht nicht nur für den direkten Zellbefall, sondern auch für die Möglichkeit der Viren, sich in den Hepatozyten zu vermehren. Eine massive Apoptose sowie geschädigte Zellmembranen, leichte Inflammation der Portalfelder mit Lymphozyteninfiltraten und leichte bis moderate fokale lobuläre Entzündung waren histopathologische Befunde, die die These einer Zytotoxizität stark untermauern [126].

Des Weiteren kann die Leberbeteiligung sekundärer Art sein. Komplikationen einer COVID-19-Pneumonie präsentieren sich als ARDS, Sepsis/Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und Multiorganversagen und führen bei einem geringen Anteil der Patienten zur Schocksymptomatik [77]. Dies verursacht eine hypoxisch-ischämische Schädigung der Leber, was als ischämische Hepatitis oder Schockleber bezeichnet wird. Eine arterielle Durchblutungsstörung nach Pumpversagen bei Sepsis führt zu einer Sauerstoffunterversorgung der zentrilobulären Läppchenanteile. Bei länger andauernder Hypoxie von über 24 Stunden nekrotisiert das zentrale Läppchengewebe und Transaminasen und LDH-Werte steigen stark an [117]. Außerdem agieren die anschließend im oxidativen Stress entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als sekundäre Botenstoffe und verursachen eine verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren [37]. Nach Kardiomyopathien, die bei COVID-19-Patienten auffielen, kann es zu einer kardialen Stauungsleber infolge einer rechtsventrikulären Pumpstörung kommen [101].

Die Leber ist verantwortlich für die Homöostase des Immunsystems, indem sie an der Immunüberwachung mit ihren antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten sowie mit der Synthese von Proteinen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems teilnimmt [4]. Eine vorbestehende chronische Lebererkrankung, die eine Zirrhose, chronische Hepatitis B und/oder Hepatitis C, metabolisch assoziierte

Fettlebererkrankung (MAFLD)<sup>1</sup> und/oder Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) und eine Autoimmunhepatitis umfasst, sensibilisiert die Leber für den oben genannten oxidativen Stress und ist assoziiert mit einer Dysfunktion des Immunsystems [4]. Zudem wurde in der bisher größten Auswertung gesundheitsbezogener Daten gezeigt, dass eine zugrundeliegende Lebererkrankung ein Risikofaktor für das Versterben an COVID-19 ist [127]. Dies veranlasste beispielsweise die American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) eine strengere Überwachung von vorerkrankten Patienten und ein Weiterführen von Screening der Leberparameter und Medikation zu empfehlen [1]. Die Prävalenz einer Lebererkrankung unter COVID-19-Patienten reicht von 2% bis 11%, jedoch mit der Anmerkung, dass aufgrund der bis dato steigenden Infektionszahlen noch keine endgültigen Aussagen getroffen werden können [134]. Eine weitere multizentrische Studie aus den USA bestätigte das höhere Letalitätsrisiko unter vorerkrankten Patienten und konnte außerdem zeigen, dass das Risiko bei Patienten mit einer Zirrhose noch höher lag. Interessanterweise unterschieden sich die durchschnittlichen Werte der Leberparameter nicht zwischen Patienten mit und ohne Lebererkrankung [107]. Viele COVID-19-Patienten erlitten eine Dekompensation ihrer Zirrhose, ohne respiratorische Symptome zu zeigen, was dafür spricht, dass eine Hepatopathie auch ein autonomer Risikofaktor ist und nicht nur sekundär als Folge einer hypoxisch-ischämischen Schädigung das Outcome von COVID-19 verschlechtert [81]. Die häufigsten Komorbiditäten bei COVID-19 sind Hypertonie, Adipositas, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen [39]. Dies sind Faktoren, die unter dem metabolischen Syndrom zusammengefasst werden. Die MAFLD wird als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms gesehen und unter diesen Begriff fallen Lebererkrankungen, bei denen eine vermehrte Fettspeicherung in der Leber zu finden ist, mit per definitionem einer Lipidakkumulation in mehr als 5% der Hepatozyten [145]. Sie ist die weltweit häufigste Lebererkrankung, was viele Patienten auch aufgrund der häufigen Koexistenz der metabolischen Begleiterkrankungen einem höheren Risiko aussetzt, einen gravierenden COVID-19-Verlauf zu entwickeln. Bezüglich der MAFLD wurde ein erhöhtes Risiko einer negativen COVID-19-Entwicklung, eine höhere Wahrscheinlichkeit von pathologisch erhöhten Leberparametern und eine länger andauernde Virusausscheidung festgestellt [58].

Bis dato gibt es keine Behandlungsleitlinie für COVID-19, sodass viele verschiedene Therapeutika noch in klinischen Studien untersucht werden und mangels eindeutiger klinischer Daten oft im off-label-use verwendet werden. Darunter sind die Folgenden mögliche Auslöser einer medikamenteninduzierten Hepatotoxizität (engl. *drug-induced liver injury*, DILI): die Virostatika Lopinavir/Ritonavir und Remdesivir, das Antibiotikum Azithromycin, Paracetamol, Hydroxychloroquin, Steroide und der humanisierte monoklonale Antikörper Tocilizumab [146]. Die Behandlung mit Lopinavir/Ritonavir erhöht zwei Studien aus China zufolge die Wahrscheinlichkeit eines Leberschadens [21,35].

---

<sup>1</sup> NAFLD wurde im Februar 2020 zu *metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease* (MAFLD) umbenannt, weswegen im Folgetext ausschließlich der aktuelle Name verwendet wird [33].

Remdesivir (Veklury®) ist das erste Medikament, das von der Europäischen Kommission eine bedingte Zulassung erteilt bekommen hat. Das Nukleosidanalogen ist seit dem 3. Juli 2020 für die Behandlung von Erwachsenen und Jugendlichen über zwölf Jahren indiziert, bei denen eine COVID-19-Pneumonie mit Sauerstoffpflichtigkeit vorliegt. Sehr häufige Nebenwirkungen sind allerdings Leberwerterhöhungen, sodass die Behandlung, die aufgrund der bewiesenen Wirksamkeit vermehrt eingesetzt werden könnte, zu einer DILI führen kann [11,36].

Einige Fälle von hepatozellulärer Schädigung ein bis drei Wochen nach Ansetzen von Azithromycin wurden beschrieben, welches initial häufig bei COVID-19-Patienten verschrieben wurde, wenn sich zusätzlich zur viralen eine ambulant erworbene bakterielle Pneumonie entwickelte [74].

Hydroxychloroquin, derzeit u.a. zur Behandlung von Malaria zugelassen, wurde zu Beginn der Pandemie vermehrt eingesetzt. Bekannte Nebenwirkungen bei empfohlenen Dosierungen sind neben Herzrhythmusstörungen auch Beeinträchtigungen der Leberfunktion, sodass die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft am 29. April 2020 eine Warnung und die dringende Empfehlung zur engmaschigen Überwachung der mit Hydroxychloroquin behandelten Patienten empfahl [11,147].

Tocilizumab, der monoklonale IgG-Antikörper des IL-6-Rezeptors, hatte in kleinen Studien einen positiven Effekt aufgewiesen, indem er den durch SARS-CoV-2 ausgelösten Zytokinsturm durch eine Blockade des pro-inflammatorischen IL-6 eingedämmt hat [29]. Häufig erhöhen sich die Leberenzyme während einer Behandlung und Fälle von Leberschädigung und akutem Leberversagen sind beschrieben worden [146].

Das Zytokinsturm-Syndrom mit stark erhöhten Werten von IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, GCSF, MCP1, MIP1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , CRP und Ferritin wurde bereits im März 2020 bei schwerst erkrankten Patienten beschrieben, wovon IL-6 und Ferritin mit erhöhter Mortalität assoziiert wurden [77]. Die zuvor beschriebenen möglichen Ursachen einer Leberschädigung können einzeln oder zusammengenommen als „First Hits“ dazu führen, dass die Leber bereits vor der hyperinflammatorischen Phase so stark beeinträchtigt ist, dass die Zytokin-medierte Mechanismen als „Second Hits“ zur Inflammation und Apoptose der Hepatozyten führen. Eine vorbestehende MAFLD oder Steatose könnte wiederum durch Chemokine während der Infektion exazerbieren [148]. Ein Zytokinsturm ist definiert durch eine unangepasste Antwort des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems auf Infektionen und Zellschädigungen, wobei eine Hyperzytokinämie auftritt. Die Pathogenese ist in ihrer Komplexität noch nicht genau verstanden. Wahrscheinlich besteht eine positive Rückkoppelung zwischen Immunzellen und Zytokinen, die lokal sowie systemisch eine gravierende Entzündungsreaktion mit hoher Mortalität auslösen kann. Dies ist beispielsweise beim ARDS (auch unabhängig von COVID-19), der hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) oder dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) beobachtet worden [14,77]. Folgende Kaskade wird für die Infektion mit SARS-CoV-2 angenommen, die sich vor allem in den Alveolarzellen der Lunge, aber auch an den Hepatozyten und Cholangiozyten abspielen kann. Als

Folge eines Zellbefalls durch das Coronavirus binden Makrophagen über ihre Mustererkennungsrezeptoren (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR) die Pathogene, phagozytieren sie und präsentieren im Anschluss die Antigenfragmente den naiven Lymphozyten. Sie triggern somit eine Entzündungsreaktion, indem sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  steigern und zusätzlich die Lymphozyten zu den reifen Effektorzellen CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und regulatorischen T-Zellen primen. Diese produzieren wiederum proinflammatorische und chemotaktische Zytokine wie IL-2, IFN- $\gamma$  und MCP-1, welche die Autostimulation von T-Helferzellen, die Aktivität von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten sowie eine Induktion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten verursachen. Folgerichtig führt die Kaskade zur Apoptose und Nekrose infizierter Zellen. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer oft beobachteten Lymphopenie, sodass ein Ungleichgewicht zwischen überschießender unspezifischer Immunantwort und geschwächter adaptiver Immunantwort mit mangelhafter Ausbildung von Gedächtniszellen vorzuliegen scheint. Makrophagen erzeugen außerdem ROS durch ihren Respiratory Burst, womit Pathogene bekämpft werden. Die Radikale werden jedoch auch nach extrazellulär abgegeben und können dort benachbarte Zellen (z.B. Hepatozyten) schädigen. Die ROS selbst sind in der Lage, die Synthese von neuen PRRs und Transkriptionsfaktoren zu stimulieren, die folglich mehr der proinflammatorischen Zytokine produzieren. Die Regulation der Produktionsmenge von Zytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren entgleist, und im Rahmen eines Multiorganversagens wird auch gesundes Gewebe zerstört. Geschädigte und phagozytierte Zellen schütten zusätzliche inflammatorische Marker aus, die mit den PRR interagieren und weiter inflammatorische Prozesse triggern [14].

Die Leber ist besonders von der überschießenden Immunreaktion betroffen, da sie einen großen Anteil an Makrophagen (Kupffer-Zellen), Lymphozyten und zytokinproduzierenden Zellen (geschädigte Hepatozyten) enthält und für die Produktion von Akute-Phase-Proteinen verantwortlich ist [58,129]. Kupffer-Zellen und Hepatozyten synthetisieren außerdem Komplementfaktoren, darunter C5a, dessen Rezeptor auf Sinusendothelzellen, Kupffer-Zellen und Myofibroblasten exprimiert wird. C5a löst eine Chemotaxis von Leukozyten aus, steigert die Gefäßpermeabilität und führt ebenfalls zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Interessanterweise wurde eine Verknüpfung zwischen C5 und dem Schweregrad der Leberfibrose gefunden [51].

### 2.3 Genetische Risikofaktoren für Lebererkrankungen

Eine Vielzahl an genetischen Risikofaktoren einer Lebererkrankung ist bereits gefunden worden und einige unter ihnen haben Einzug in die Routinediagnostik der Labore gehalten. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den genetischen Varianten, die zu einem  $\alpha$ -1-Antitrypsin (A1AT)-Mangel, einer Steatose und einem Vitamin-D-Mangel führen können. Zudem wird in einem neuen Ansatz der Einfluss der AB0-Blutgruppenzugehörigkeit auf eine Hepatopathie untersucht, wobei die Blutgruppen der Patienten eben-

falls durch genetische Analysen bestimmt wurden. Die Hypothese, dass sich Leberparameter bei Vorliegen dieser Risikofaktoren oder bei Zugehörigkeit einer bestimmten Blutgruppe des ABO-Systems verschlechtern, soll in dieser Arbeit überprüft werden.

Die molekulargenetischen Analysen fokussieren auf die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) in Genen der Patienten-DNA. Ein SNP eines Gens liegt vor, wenn es zu einem Austausch eines einzelnen Basenpaares in einem komplementären DNA-Doppelstrang kommt [8]. Es sind somit vererbare Einzelbasensubstitutionen und stellen die häufigste Art genetischer Variabilität des Menschen dar [26]. Das veränderte Allel eines SNPs kann entweder phänotypische Konsequenzen haben, welche wiederum vorteilhaft oder krankheitsursächlich für den menschlichen Körper sein können, oder aber funktionslos bleiben [9]. Dies liegt unter anderem daran, dass SNPs in kodierenden als auch in nicht kodierenden intronischen Genregionen auftreten können [26].

Es wird nacheinander auf die Basenaustausche eingegangen und deren klinische Auswirkungen beschrieben, um die Wahl der SNPs zu begründen und einen möglichen Zusammenhang mit der Erkrankung des neuartigen Coronavirus anzufügen.

- **$\alpha$ -1-Antitrypsin-Mangel**

A1AT-Mangel ist eine autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung, bei der aufgrund einer Genmutation zu wenig A1AT gebildet oder sekretiert wird. A1AT ist ein hauptsächlich in den Hepatozyten synthetisierter Inhibitor von Serinproteasen wie Trypsin, neutrophiler Elastase, Plasmin und Chymotrypsin. Diese Proteasen werden bei Entzündungsprozessen aus neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet und dienen dem Schutz des empfindlichen Alveolargewebes der Lunge. Damit das Lungengewebe jedoch von den Proteasen nicht selbst zersetzt wird, inaktiviert A1AT sie irreversibel. Bei Gesunden liegen die Serumwerte von A1AT zwischen 0,9 und 2g/l, wobei sie während einer Akuten-Phase-Reaktion auf das Vier- bis Fünffache ansteigen können. Ebenfalls erhöht sind die Werte in fortgeschrittenem Alter [57]. Dem Mangel an A1AT liegt eine Genmutation des polymorphen *SERPINA1*-Gens (serine protease inhibitor, group A, member 1) zugrunde, welches auch Protease-Inhibitor-Gen (PI) genannt wird. Das Gen hat zwei Allele, von denen die normalen mit *M* bezeichnet werden und bei 85%-90% der Bevölkerung auftreten. Die am häufigsten vorkommenden mutierten Allele sind *S*, als Resultat des SNPs rs17580 und *Z* (rs28929474) [16]. In der Promotor-Region des *SERPINA1*-Gens kann es ebenfalls zu einem Basenaustausch durch den SNP rs8004738 kommen, welcher ein genetischer Risikofaktor für Lebererkrankungen innerhalb der Gruppe homozygoter *Z*-Allel-Träger sein könnte [24]. Der PI-S-Genotyp führt zu einer Instabilität des Genprodukts durch intrazellulären Abbau und zu einer leichten Verminderung des Serum-A1AT. Im Unterschied dazu resultiert die *Z*-Mutation in einer Retention von

A1AT im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten und somit neben stark verminderten Serumwerten auch in einer Zellschädigung der Leber [84]. Daher sind homozygote Träger des PI-Z-Allels prädisponiert, eine Lebererkrankung zu entwickeln. Bezüglich extrahepatischer Manifestationen ist der A1AT-Mangel eine Ursache für ein Lungenemphysem in jungen Jahren, für obstruktive Ventilationsstörung vor allem bei Rauchern, für eine systemische Vaskulitis und für mögliche weitere inflammatorische, autoimmune und neoplastische Erkrankungen [111].

Wie oben bereits erläutert, zeigten Hoffmann et al., dass SARS-CoV-2 als Eintrittspforte in den menschlichen Körper das ACE2-Enzym nutzt. Es benötigt jedoch weiterhin die Transmembranserinprotease TMPRSS2, die das Spike-Protein des Virus spaltet und es somit aktiviert [52]. Diese Protease TMPRSS2 wird wiederum durch A1AT gehemmt, was 2015 erstmals von Esumi et al. [34] untersucht wurde. Liegt ein A1AT-Mangel bei einem Menschen vor, ist weniger A1AT im Serum vorhanden und daher könnte dieser folglich anfälliger für eine Infektion mit SARS-CoV-2 oder für einen fulminanteren Verlauf der Infektion sein.

- **Vitamin D- Mangel**

Vitamin D (Calciferol) ist ein fettlösliches Vitamin und zählt zur Stoffklasse der Steroide. Die beiden Formen Vitamin D2 (Ergocalciferol) und Vitamin D3 (Cholecalciferol) unterscheiden sich nicht in ihrer physiologischen Funktion, jedoch im Aufbau ihrer Seitenkette und anhand der Tatsache, dass Vitamin D3 als einziges Vitamin vom menschlichen Körper synthetisiert werden kann. Mit der Nahrung kann Vitamin D2 mit Pilzen aufgenommen werden, wohingegen Vitamin D3 in tierischen Produkten, darunter vor allem in fettigem Fisch und Eiern vorhanden ist. Beide Formen müssen in enzymatischen Reaktionen aktiviert werden, was im Folgenden als Grundlage für das Verständnis der SNPs des Vitamin D-Metabolismus erläutert werden soll. In der Leber wird zunächst aus dem körpereigenen Cholesterin mittels des Enzyms Cholesterin-Dehydrogenase das Provitamin D3 (7-Dehydrocholesterin) synthetisiert, welches in der Zellmembran der Haut gespeichert wird. UV-Strahlung des Sonnenlichts spaltet es in der Haut zu Cholecalciferol, dem inaktiven Vitamin D3. Gebunden an das Vitamin-D-Bindeprotein (DBP; *group-specific component globulin (GC)*), das mit allen Vitamin-D-Metaboliten einen Komplex eingeht, zirkuliert es im Blut und kann so zu Leber und Niere transportiert werden, wo es in zwei aufeinanderfolgenden Schritten hydroxyliert wird. Zuerst hydroxyliert das Enzym Cytochrom P4502R1 (*CYP2R1*) in der Leber Cholecalciferol zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol; 25(OH) Vitamin D). Dessen Konzentration im Serum ist der verlässlichste Indikator des Vitamin-D-Status [75]. Serumwerte von 25(OH) Vitamin D zwischen 30 ng/ml und 100 ng/ml spiegeln eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D wieder, während Vitamin D-Insuffizienz mit Werten unter 30ng/ml und Vitamin D-Mangel ab Serumwerten unter 20ng/ml festgelegt wurde [54,55].

An DBP gebunden gelangt Vitamin D3 zur Niere, wo die Hydroxylierung zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase (*CYP27B1*) abläuft und wieder an DBP gebunden in die

Blutbahn abgegeben wird. Inaktiviert wird es genau wie Calcidiol durch die 24-Hydroxylase (*CYP24A1*) und wird anschließend über die Galle ausgeschieden [60].

Calcitriol entfaltet seine Wirkung hauptsächlich mittels Aktivierung spezifischer Gene durch Bindung an den nukleären Vitamin-D-Rezeptor und hat im menschlichen Körper vielfältige Eigenschaften inne: Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels sowie des Knochenaufbaus, Beeinflussung der Zelldifferenzierung und Zellproliferation, des kardiovaskulären Systems sowie der Muskelfunktion und Immunmodulation. Klinisch zeigt sich ein Vitamin-D-Mangel als Rachitis bei Kindern und Osteomalazie bei Erwachsenen [60]. Ein Mangel konnte des Weiteren auch mit der Entwicklung von Infektionen, wie der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) in Verbindung gebracht werden [69]. Außerdem wurde er mit chronischer Lebererkrankung in Folge einer MAFLD assoziiert, und darüber hinaus spielt er eine Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten wie dem insulinabhängigen Diabetes mellitus und bestimmten Krebsleiden (Kolon-, Prostata- und Mammakarzinom) [55,85].

Als Ätiologie einer Veränderung des Vitamin-D-Status konnten neben Fehlernährung, mangelnder Sonnenlichtexposition, hohem Alter und hohem Body Mass Index (BMI) auch genetische Faktoren eruiert werden [76]. In drei genomweiten Assoziationsstudien (*genome wide association study*, GWAS) wurde von multiplen Polymorphismen berichtet, die Gene des Vitamin D-Metabolismus betreffen und die Serumwerte von 25(OH)-Vitamin-D negativ beeinflussen [2,59,125]. Ahn et al. [2] fanden in ihrer GWAS Polymorphismen des *GC*-Gens (rs7041), des *DHCR7*-Gens (rs12800438) und des *CYP2R1*-Gens (rs10741657), Wang et al. [125] entdeckten den zusätzlichen SNP des *CYP24A1*-Gens (rs17216707) und Jiang et al. [59] konnten dem zwei weitere Genvarianten von *AMDHD1* (rs10745742) und *SEC23A* (rs8018720) hinzufügen.

Das *GC*-Gen kodiert für das Vitamin-D-Bindeprotein, ein Glykoprotein, welches alle Vitamin-D-Metaboliten zu den Zielorganen transportiert. Heterozygote und homozygote Träger des Risikoallels weisen niedrigere 25(OH)-Vitamin-D-Spiegel auf als Träger des Wildtyp-Allels [2]. *DHCR7* ist die Bezeichnung der 7-Dehydrocholesterolreduktase, die das in der Haut gespeicherte 7-Dehydrocholesterol zu Cholesterin konvertiert und somit die Vitamin-D-Synthese limitiert. Homozygote Träger des selteneren Allels zeigten ebenfalls niedrigere 25(OH)-Vitamin-D-Spiegel [2]. Um die Auswirkungen auf die Leber zu unterstreichen, kann angemerkt werden, dass der SNP des *DHCR7*-Gens außerdem als Risikofaktor für erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung eingestuft werden konnte [45]. Der Polymorphismus des *CYP2R1*-Gens beeinflusst negativ die Funktion des mikrosomalen Enzyms, welches Cholecalciferol zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) hydroxyliert und ist als Ursache einer hereditären Form der Rachitis bekannt [112]. Das *CYP24A1*-Enzym, induziert von Calcitriol selbst, katalysiert die Inaktivierung von Calcitriol und Calcidiol und ist wichtiger Bestandteil der Vitamin-D-Ausscheidung [76,125].

*AMDHDI* (amidohydrolase domain containing 1) ist das kodierende Gen des Enzyms Amidohydrolase, involviert in dem Abbau von Aminosäuren wie Histidin, Lysin und Phenylalanin und konnte als vererbbarer Faktor für Serumwertveränderungen von 25(OH)-Vitamin D identifiziert werden, indem das Majorallel C verantwortlich für eine Senkung des Vitamin D-Spiegels ist [59]. Dies trifft ebenfalls für das Protein *SEC23A* zu, das als Teil eines Komplexes aus Hüllproteinen eine Rolle beim Transport von proteinbeladenen Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat spielt, die von dort sekretiert werden. Das Risikoallel von *SEC23A* ist das Majorallel und senkt die Vitamin-D-Konzentration [59].

Aufgrund der großen Rolle der Leber im Vitamin-D-Metabolismus wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Leberwerte in Anwesenheit der genetischen Risikofaktoren verschlechtern, was wiederum eine negative Auswirkung auf die Genese einer SARS-CoV-2-Infektion haben könnte. Gestützt wird die Hypothese durch die Tatsache, dass Vitamin D-Mangel zur Entwicklung des ARDS beiträgt. Ebenfalls relevant ist das hohe Alter der Patienten, mit dem die Fallsterblichkeit durch SARS-Cov-2 steigt [104]. Mit steigendem Alter neigt die Vitamin D-Konzentration dazu zu sinken, was für die Rolle von Vitamin D bei COVID-19 sprechen könnte. Adipositas ist ebenfalls ein wichtiger Faktor, der nicht außer Acht gelassen werden darf, seitdem erkannt wurde, dass es einen fatalen Verlauf von COVID-19 wahrscheinlicher macht [39]. Übergewichtige und adipöse Menschen haben einen niedrigen Vitamin-D-Spiegel und leiden allgemein an einer herabgesetzten Funktion ihres Immunsystems, was sie anfälliger für Infektionen jeglicher Art macht [76]. Bereits im März 2020 erschienen daher mehrere Empfehlungen, dass Menschen mit erhöhtem Risiko an COVID-19 zu erkranken, mit Vitamin D supplementiert werden sollten [43,56].

- **Steatose**

Die Allelvarianten der Gene *patatin-like phospholipase domain containing 3* (*PNPLA3*; rs738409), *membrane bound O-acyltransferase domain containing 7* (*MBOAT7*; rs641738) und *transmembrane 6 superfamily member 2* (*TM6SF2*; rs58542926) stellen allesamt genetische Risikofaktoren für alkoholische Leberzirrhose sowie für die MAFLD dar, was in mehreren GWAS und multizentrischen Studien beschrieben wurde [19,65]. Die Allelvarianten sollen hier in ihrer signifikanten Rolle neben Umweltfaktoren wie hyperkalorische Ernährung und Bewegungsmangel bei der Entstehung der Lebersteatose, Fibrose und daraus entstehender Zirrhose erklärt werden, um deren Auswahl für diese Untersuchung der Leberbeteiligung bei COVID-19 zu begründen.

Der SNP rs738409 im *PNPLA3*-Gen ist signifikant assoziiert mit erhöhtem Leberfettgehalt, Leberentzündung, Zirrhose, Hepatozelluläres Karzinom (HCC) und sogar mit erhöhter Gesamtmortalität [65,98,109]. Das Gen enthält Informationen für die Synthese des multifunktionellen Enzyms Adiponutrin, welches zur Familie der Patatindomäne-beinhaltenden Proteine gehört und u.a. in der Leber, Niere, Haut und im braunen und weißen Fettgewebe exprimiert wird [66]. Es hat große Ähnlichkeit zur Adi-

pozyten-Triacyglyzerin-Lipase (ATGL/PNPLA2), dem ersten Enzym der Lipolyse, welches die Triglyzerid-Hydrolyse katalysiert. Adiponutrin besitzt ebenfalls eine Triglyzerid-Hydrolaseaktivität, womit ihm eine Rolle im Lipidstoffwechsel der Leber zugesprochen wird. Gezeigt werden konnte, dass eine vermehrte Expression von PNPLA3 durch erhöhte Aufnahme von Kohlenhydraten und Fettsäuren induziert wird [133]. Das durch die I148M-Variante veränderte Enzym verliert einerseits seine Hydrolase-Funktion und entzieht sich andererseits dem proteolytischen Abbau und sammelt sich vermehrt auf hepatischen Lipidtröpfchen an [12]. Yang et al. [131] konnten eine starke Interaktion zwischen PNPLA3 und dem Protein  *$\alpha/\beta$ -hydrolase-domain-containing 5* (ADHB5) zeigen. Das ADHB5-Protein ist ein wichtiger Co-Aktivator der ATGL, kann jedoch stärker vom veränderten Adiponutrin gebunden werden. Aufgrund dieser Sequestrierung steht es der ATGL nicht mehr zur Verfügung und die in den Hepatozyten vorhandenen Triacylglyceride werden nicht mehr hydrolysiert. Die verminderte Lipolyse resultiert somit in einer Vermehrung und Vergrößerung von hepatischen Lipidtröpfchen. Verglichen mit den anderen beiden SNPs tendieren Träger der Allelvariante im *PNPLA3*-Gen verstärkt zu einer Progression der MAFLD in Richtung Leberfibrose und NASH [65]. Eine mögliche Ursache dieser Progression konnte in der Hyperexpression des NLRP3 (*nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptor family pyrin domain-containing 3*)-Inflammasoms bei Vorliegen einer Homozygotie des *PNPLA3*-Risikoallels gefunden werden. Das NLRP3-Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex des innate Immunsystems, welches nicht nur auf Erregerbestandteile (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), sondern auch auf Zellbestandteile von geschädigtem Gewebe (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) reagiert und somit eine „sterile Inflammation“ (Inflammation von Gewebe ohne Vorliegen einer Infektion) auslösen kann. Es aktiviert die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18, welche wiederum die Lipidakkumulation in Hepatozyten verstärken und die Hepatozyten für TNF- $\alpha$  sensibilisieren. Exprimiert wird das Inflammasom verstärkt in Hepatozyten, Ito-Zellen und Endothelzellen der Sinusoide bei Patienten mit NASH und dem *PNPLA3*-Risikoallel im Vergleich zu gesunden Patienten. Dies spricht für die Rolle des Inflammasoms in der negativen Entwicklung der NAFLD zur Steatohepatitis [80].

Der *MBOAT7*-Polymorphismus wurde zuerst als Prädiktionsfaktor für alkoholbedingte Leberzirrhose entdeckt, ist jedoch auch verbunden mit einem verstärkten Auftreten von MAFLD und einer sich daraus entwickelnden Leberfibrose [19,65]. Das Minorallel konnte mit einem höheren Steatosegrad, schwerwiegender Inflammation sowie stärkerer Fibrose assoziiert werden [72]. *MBOAT7* kodiert für die Lyso-phospholipid-Acyltransferase 7 (LPLAT7) [19]. Es katalysiert die Reacylierung von Lyso-phosphatidylinositol (LPI) zu Phosphatidylinositol (PI; ein Phosphoglycerid) im Phospholipid-Remodeling-Pathway. Dieser Umbauprozess ist auch bekannt unter dem Namen *Lands' Cycle*, in dem die Anordnung und Verteilung von Fettsäuren der Phospholipide nach deren *De-novo*-Synthese noch verändert werden. Membranphospholipide sind metabolisch aktiv und durchlaufen eine Reihe von Deacylierungs- und Reacylierungsreaktionen, die zum Einbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren an neu synthetisierten Phospholipiden führen [zitiert nach 123]. LPLAT7 fügt in diesem Prozess eine Fettsäure in Beisein von

Acyl-Coenzym A als Acylgruppen-Donor den Phospholipiden hinzu [123]. Des Weiteren konnte eine Aktivität der LPLAT7 in den inflammatorisch wirkenden neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, wo es eine wichtige Rolle des Arachidonsäure-Metabolismus innehat [42]. Das Signalmolekül Arachidonsäure ist eine ungesättigte Fettsäure, die aus den Phosphoglyceriden abgespalten wird und als Ausgangssubstanz für die Synthese der Eicosanoide fungiert [42]. Als Eicosanoide werden Prostaglandine, Thromboxan A<sub>2</sub> und Leukotriene zusammengefasst, von denen vor allem die Leukotriene in neutrophilen Granulozyten an inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind. Für *MBOAT7* wurde bewiesen, dass es die Menge an freier Arachidonsäure reguliert, indem es sie in die Phospholipide einfügt. Somit ist Arachidonsäure nicht mehr für die Synthese der Leukotriene verfügbar, die für eine Inflammation in Hepatozyten und anderen Organen mitverantwortlich sind [42].

Die Genvariation des Locus *TM6SF2* ist ein Risikofaktor für MAFLD und alkoholbedingter Leberzirrhose auf der einen und ein protektiver Faktor gegen kardiovaskuläre Erkrankungen auf der anderen Seite [19,30,63]. Das gleichnamige Enzym ist beteiligt an der Sekretion von Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL). Lipoproteine transportieren Triacylglycerine und Cholesterin im Blut zu ihrem definierten Zielort und werden anhand ihrer Dichte (Protein-Anteil) unterschieden. VLDLs sind verhältnismäßig aus einem großen Anteil an Triacylglycerinen und etwa aus 10% Proteinen zusammengesetzt, werden im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten synthetisiert und transportieren von dort Triacylglycerine und Cholesterin in extrahepatisches Gewebe [6]. *TM6SF2* konnte ebenfalls im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten lokalisiert werden, und die untersuchte Mutation des Enzyms führt zu einem instabilen Protein, welches den zellulären Export von Triglyceriden und Cholesterin aus den Hepatozyten verringert [71]. Folglich ist ein erhöhter Triglyceridgehalt in den Hepatozyten und ein verringerter Gehalt an Serumlipiden bei homozygoten Trägern messbar [30,65]. Diese Kombination schützt zwar den Patienten vor Arteriosklerose und damit einhergehend dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, steigert jedoch das Risiko einer hepatischen Inflammation und einer Leberfibrose [30].

- **AB0-Blutgruppen-Abhängigkeit bei COVID-19**

Das AB0-Blutgruppensystem ist eines der gegenwärtig 34 anerkannten Blutgruppenklassifikationen und das wichtigste weltweit für Bluttransfusionen. Es besteht aus drei Antigenen (A, B und H), die die vier phänotypischen Blutgruppen A, B, AB und 0 definieren. Die Antigene sind in der Erythrozytenmembran verankerte Glykolipide, die sich untereinander anhand eines terminalen Zuckerrestes unterscheiden. Alle Erythrozyten unabhängig von ihrer Blutgruppe tragen das H-Antigen, ein Kohlenhydratanteil aus den fünf Monosacchariden Glukose, Galaktose, N-Acetylglucosamin, Galactose und Fucose. Durch enzymatische Reaktionen von Glykosyltransferasen wird das H-Antigen modifiziert: die A-Transferase katalysiert den Transfer von N-Acetylglaktosamin und bildet somit das A-Antigen, während die B-Transferase den Transfer von Galaktose auf das H-Antigen und folgerichtig die Bildung des B-Antigens auslöst. Beide Transferasen werden von jeweils einem A- und einem B-Allel des AB0-Gens, lokalisiert

auf dem langen Arm des Chromosoms 9, kodiert. Neben Erythrozyten exprimieren auch Thrombozyten, Zellen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes und Zellen in Sekreten die charakteristischen Antigene. Die Häufigkeitsverteilung der Blutgruppen variiert stark zwischen verschiedenen ethnischen Bevölkerungen. Die folgende Tabelle vergleicht vier Regionen, aus denen eine große Anzahl an COVID-19-Patienten stammt und für sie daher eine gute Datenlage besteht.

**Tabelle 1:** Häufigkeitsverteilung der AB0-Blutgruppen

<b>Blutgruppen-Phänotyp</b>	<b>Häufigkeitsverteilung nach Ländern/Kontinenten in %</b>			
	Deutschland [149]	Europa [61]	USA [27]	China [27]
<b>A</b>	43	44	40	22-29
<b>B</b>	11	10	11	26
<b>AB</b>	5	5	4	6-13
<b>0</b>	41	41	45	37

Eine Besonderheit des AB0-Systems stellen außerdem die sich im Plasma befindlichen Antikörper, die Isoagglutinine, dar. Personen tragen den Antikörper gegen das nicht vorhandene Antigen, sodass eine Person mit der Blutgruppe A Antikörper gegen das B-Antigen besitzt und umgekehrt. Blutgruppe 0 hat keine Antigene, daher befinden sich Antikörper beider Klassen im Plasma der Personen.

Eine Vielzahl an Assoziationen des Blutgruppenstatus zu Infektionskrankheiten wurde bereits hergestellt, weil zum Ersten die AB0-Antikörper Teil der innate Immunantwort gegen beispielsweise bestimmte Bakterien und behüllte Viren sind, die AB0-aktive Antigene tragen. Zum Zweiten dienen die Blutgruppen-Antigene als Rezeptoren für die Immunantwort und Pathogene können mit ihnen interagieren, indem sie sie als Rezeptoren für den Zelleintritt oder eine Inflammationsantwort benutzen [27]. Bezüglich SARS-CoV wurde herausgefunden, dass Blutgruppe 0 ein protektiver Faktor gegen eine Infektion war. Es wird vermutet, dass Personen mit Blutgruppe 0 dank ihrer Antikörper gegen A und B eine Resistenz aufzeigen, da eine Studie mit anti-A-Antikörper mit hohen Titern eine effektive Inhibition der Virusinteraktion mit der Wirtszelle zeigte [27].

Ellinghaus et al. [32] untersuchten als Erste in ihrer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS, engl. Genome-wide association study) eine mögliche Verknüpfung von Blutgruppenstatus und SARS-CoV-2-Infektion bei 1610 Patienten aus Spanien und Italien. Eine unterschiedliche Verteilung der Blutgruppen zwischen Patienten und der Kontrollkohorte wurde verzeichnet. Dem kann entnommen werden, dass Patienten mit Blutgruppe A ein höheres Risiko haben, einen progressiven Verlauf bis zum respiratorischen Versagen zu erleiden, im Vergleich zu Patienten mit Blutgruppe B, 0 oder AB. Blutgruppe 0 weist währenddessen ebenfalls einen protektiven Effekt auf.

## 2.4 Zielsetzungen

Das Ziel dieser Arbeit ist, ein genaueres Verständnis der Leberbeteiligung bei Patienten mit einer SARS-CoV-2-Infektion zu erlangen. Es soll ein Beitrag dazu geliefert werden, wie sich Risikofaktoren, darunter Einzelbasensubstitutionen bestimmter Gene, die Blutgruppenzugehörigkeit, das Alter und das Geschlecht auf die Hepatopathie bei COVID-19 auswirken und wie ein charakteristischer Verlauf der leberspezifischen Parameter während der noch weitgehend unbekanntes Krankheit aussehen kann. Sie fokussiert auf den Zusammenhang der Leberwerte mit Entzündungsmarkern, dem 25(OH)-Vitamin D-Status und dem Outcome von 61 Patienten am Universitätsklinikum des Saarlandes. Das Outcome wird hier definiert als: Notwendigkeit intensivmedizinischer Behandlung bei COVID-19-Pneumonie, invasiver Beatmung, ECMO-Therapie und Tod.

Seit Dezember 2019 breitet sich das neuartige, pandemische Coronavirus rapide über die gesamte Welt aus und lässt Staaten in tiefen wirtschaftlichen, politischen und gesundheitsökonomischen Krisen zurück. In Ermangelung effektiver medikamentöser Behandlungsstrategien, ist es eine essentielle Aufgabe, Menschen vor einer Infektion, vor einem progressiven Verlauf und vor Komplikationen mit Folgeschäden zu schützen und mögliche Therapien zu entwickeln.

Eine Hepatopathie tritt häufig unter COVID-19-Patienten auf und ist meist von milder Natur, sodass ein Großteil der Infizierten vollständig genesen kann [96]. Sie ist jedoch häufiger bei schwer verlaufenden Fällen, was die Frage aufwirft, ob die Hepatopathie ursächlich für die Aggravierung ist oder durch sie hervorgerufen wird. Ein geringer Anteil der Patienten leidet an massiven Organschäden, darunter auch einem Leberversagen und verstirbt im Verlauf. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft wird eine multifaktorielle Ursache für die abnormen Leberwerte diskutiert. Möglich sind ein direkter zytopathischer Befall der Hepatozyten, ein hypoxisch-ischämischer Leberschaden, eine Aggravierung vorbestehender Lebererkrankung, eine arzneimittelinduzierte Hepatitis und/oder eine hyperinflammatorische Reaktion im Rahmen eines Zytokinsturms [89]. Die Faktoren können autonom für sich oder im Zusammenwirken zu einer Leberstörung führen. Wie die Literatur zeigt, präsentiert sich eine Hepatopathie unter einer SARS-CoV-2-Infektion mit pathologischen leberspezifischen Laborwerten und Entzündungsmarkern. Das Interesse der Studie erwächst aus der Erfassung dieser Daten im Verlauf und vergleicht die Schwankungen nach Outcome der Patienten. Des Weiteren konzentriert sie sich auf das Auffinden möglicher Faktoren, die zu einem höheren Risiko einer Leberbeteiligung und/oder einer fatalen Infektion führen. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Ätiologie und Klassifikation der Hepatopathie leisten. Mit diesem Wissen können Prädiktoren für einen schweren Verlauf etabliert werden und somit in einem frühen Krankheitsstadium das Risiko eingeschätzt und entsprechende Maßnahmen zur engmaschigen Überwachung und gezielter Therapie eingeleitet werden.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie mit dem Ziel der Analyse des Einflusses von genetischen Risikofaktoren und der Blutgruppenzugehörigkeit auf die Leberwerte handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie im Rahmen der institutsübergreifenden CORSAAR-Studie. Der Name der Studie entstand aus einem Akronym der Wörter „Coronavirus“ und „Saarland“, welche als Antwort auf die Corona-Pandemie im Saarland im April 2020 von der Universität des Saarlandes und von dem Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) ins Leben gerufen wurde. Geleitet wird sie am Standort des UKS in Homburg von Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals, Direktor der Klinik für Pneumologie und von Frau Professorin Dr. med. S. Smola, Direktorin des Instituts für Virologie.

Prämisse für die Aufnahme von Patienten in die Kohorte waren die positive Testung auf SARS-Cov-2, eine stationäre Aufnahme am UKS oder am Klinikum Saarbrücken und die Volljährigkeit. Aus den Patientenakten und Arztbriefen wurden die klinischen, laborchemischen und anamnestischen Aspekte zusammengetragen, während die molekulargenetischen Mutationsanalysen der Blutproben im Labor der Inneren Medizin II am UKS durchgeführt wurden. Zudem wurde im Verlauf das Ergebnis des SARS-Cov-2-Abstriches jedes Patienten dokumentiert, welches vom Institut für Virologie zur Verfügung gestellt wurde.

Von jedem Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung seiner Daten und Probenmaterialien zu Forschungszwecken vor. Zur Durchführung der Studie gibt es ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes mit der Kennnummer 6220.

Die Patientendaten wurden nach folgenden Parametern ausgewertet [121] :

#### **Anamnestische Daten:**

- Geburtsdatum, Geschlecht, Wohnort (Postleitzahl)
- Vorerkrankung (Herz-Kreislauf-Erkrankung, Chronische Lebererkrankung, Hepatitis B/C, Chronische Lungenerkrankung, Andere (Diabetes mellitus, Adipositas, HIV-infiziert, organtransplantiert))
- Schwangerschaft
- Vormedikation

#### **Klinische Phänotypen:**

- Aufnahme, Outcome (Entlassung, Verlegung, Tod)
- Station (Normalstation, Intensivstation)

- Symptome
- Beatmungstyp (Sauerstoff-Therapie, invasive Beatmung, ECMO)
- Medikation (Antibiotika, Antivirale Therapie, Immunsuppression, Andere)
- SARS-CoV-2 Abstrich

**Laborwerte:**

**Tabelle 2:** analysierte Laborwerte

Leberparameter	Entzündungsparameter	Weitere
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Albumin (g/l)</li> <li>• Alkalische Phosphatase (U/l)</li> <li>• Bilirubin gesamt (mg/dl)</li> <li>• Transaminasen (AST (U/l), ALT (U/l))</li> <li>• Laktatdehydrogenase (U/l)</li> <li>• <math>\gamma</math>-Glutamyltransferase (U/l)</li> </ul> <p>daraus errechnet:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI)</li> <li>• FIB4-Score</li> <li>• De-Ritis-Quotient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukozyten /<math>\mu</math>l</li> <li>• Lymphozyten /<math>\mu</math>l</li> <li>• C-reaktives Protein (mg/l)</li> <li>• Ferritin (<math>\mu</math>l)</li> <li>• Procalcitonin (ng/ml)</li> <li>• Interleukin 6 (pg/ml)</li> <li>• <math>\alpha</math>1-Globuline (%)</li> <li>• <math>\alpha</math>1-Antitrypsin (mg/dl)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25-(OH)-VitaminD (ng/ml)</li> </ul>

**Molekulargenetische Analysen:**

- **A1AT-Mangel**
  - *PiS* (rs17580)
  - *PiZ* (rs28929474)
  - *SERPINA1*-Promotor (rs8004738) G(FAM)>A(VIC)
- **Steatose**
  - rs738409 (*PNPLA3*)
  - rs641738 (*MBOAT7*)
  - rs58542926 (*TM6SF2*)
- **Vitamin D – Mangel**
  - rs10745742 (*AMDHD1*)
  - rs17216707 (*CYP24A1*)
  - rs8018720 (*SEC23A*)
  - rs7041 (*GC*)

- rs12800438 (*DHCR7*)
- rs10741657 (*CYP2R1*)

- **Blutgruppen**

- rs8176719
- rs41302905
- rs8176747

### 3.2 Listung der SNPs

Von den oben gelisteten und in der Einleitung erläuterten SNPs gilt jeder für sich als genetischer Risikofaktor für Lebererkrankungen und somit in der Arbeitshypothese auch als Risikofaktor für einen fulminanteren COVID-19-Verlauf mit Leberbeteiligung. Die vorliegende Tabelle 2 listet die von Applied Biosystems vorgefertigten *TaqMan*® Assays auf und stellt die Zuordnung der Farbstoffe zu den eingebauten Basen dar.

**Tabelle 3:** Auflistung der SNPs

SNP	Gen	Assay-ID	Allel → Farbstoff
rs17580 ( <i>PIS</i> )	<i>SERPINA1</i>	C__594695_20	T = Major/Wildtyp → FAM A = Minor/Variante → VIC
rs28929474 ( <i>PIZ</i> )	<i>SERPINA1</i>	C__34508510_10	C = Major/ Wildtyp → VIC T = Minor/ Variante → FAM
rs8004738	<i>SERPINA1</i>	C__2985132_20	A = Major/ Wildtyp → VIC G = Minor/Variante → FAM
rs738409	<i>PNPLA3</i>	C__7241_10	C = Major/ Wildtyp → VIC G= Minor/ Variante → FAM
rs641738	<i>MBOAT7</i>	C__8716820_10	C = Major/ Wildtyp → VIC T = Minor/ Variante → FAM
rs58542926	<i>TM6SF2</i>	C__89463510_10	C = Major/ Wildtyp → VIC T = Minor/ Variante → FAM
rs10745742	<i>AMDHD1</i>	custom designed	C = Major/ Wildtyp → FAM T= Minor/ Variante → VIC

rs17216707	<i>CYP24A1</i>	C__33659702_10	T = Major/ Wildtyp → FAM C = Minor/ Variante → VIC
rs8018720	<i>SEC23A</i>	C__25932031_10	C = Major/ Wildtyp → VIC G = Minor/ Variante → FAM
rs7041	<i>GC</i>	C__3133594_30	A = Major/ Wildtyp → VIC C = Minor/ Variante → FAM
rs12800438	<i>DHCR7</i>	C__32063049_20	A = Major/ Wildtyp → FAM G = Minor/Variante → VIC
rs10741657	<i>CYP2R1</i>	C__2958430_10	G = Major/ Wildtyp → FAM A = Minor/Variante → VIC
rs8176719	<i>ABO</i>	Sanger Sequencing Primer	F:ACCCCTCGGCCACCTCACTGA R:CCTCTGGTTGGTTTCCCGGGG
rs41302905	<i>ABO</i>	Sanger Sequencing Primer	F:CCTTGGTGGGTTTGTGGCGC
rs8176747	<i>ABO</i>	Sanger Sequencing Primer	R:GGATTACCTGGTGTGCGTGGAC

### 3.3 Molekulargenetische Analysen

Die molekulargenetische Analysen fokussierten auf die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in oben genannten Genen aus Patienten-DNA. Alle bisher bekannten humanen SNPs sind unter anderem in der Datenbank „Ensembl“ unter [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) aufgelistet, von der in dieser Studie die Referenzdaten stammen.

Die Prüfung der Patientenblutproben auf die SNPs erfolgte durch Allelische Diskriminierung mithilfe der *TaqMan*® *SNP-Genotypisierungsassays* der Firma *ThermoFisher Scientific Inc.* Die Blutgruppen hingegen wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Die Assays stammen von der Firma *Applied Biosystems* und sind eigens für jeden SNP hergestellt worden. Mittels Real-Time PCR wurden die bestimmten DNA-Sequenzen amplifiziert und währenddessen unter Nutzung einer fluorogenen Sonde detektierbar gemacht. Im Folgenden werden die Funktionsweise der *TaqMan*®-Assays und der Sanger-Sequenzierung sowie die einzelnen Arbeitsschritte von der DNA-Isolierung bis zur Genotypisierung erklärt.

### 3.3.1 DNA-Isolierung

Allen Patienten der Studie wurde Vollblut entnommen, welches bis zur Verarbeitung mit dem Chelatbildner Ehtylendiamintetraazetat (EDTA) ungerinnbar gemacht wurde. Aus 200 µl des EDTA-Blutes wurden mit dem *QIAmp® DNA Mini Kit* der Firma *Qiagen* durchschnittlich 10-50 ng/µl DNA in 200 µl AE-Puffer isoliert. Bei dem Verfahren handelt es sich um eine Festphasenextraktion an Silikagelmembran, welche in vier aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten abläuft. Zu Beginn werden die Blutzellen bei 56°C unter Zugabe von 20 µl Protease und 200 µl Lysepuffer (*QIAmp® DNA Mini Kit*) zehn Minuten im Thermomixer lysiert, sodass die Zell- und Kernmembranen die DNA freigeben. Darauf folgt die Bindung der genomischen DNA an die Silikagelmembran einer Spin-Säule. Das Lysat wird zu diesem Zweck zuerst mit 200 µl Äthanol vermischt, um die Adsorption der DNA an die Membran zu stärken und fünf Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Anschließend wird es auf eine Spin-Säule (*QIAmp® DNA Mini Kit*) aufgetragen und bei 8000 U/min zentrifugiert, sodass sich das Lysat durch die Membran saugt und die DNA an die Membran gebunden wird. Im dritten Schritt wird die Spin-Säule mittels 500 µl des Puffers AW1 (*QIAmp® DNA Mini Kit*) gewaschen, um die DNA von kontaminierenden Proteinen zu reinigen und anschließend eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Darauf folgt ein erneutes Waschen mittels 500 µl des Puffers AW2 (*QIAmp® DNA Mini Kit*) und einer anknüpfenden Zentrifugation für drei Minuten bei 13000 U/min. Die Ablösung der DNA von der Spin-Säule erfolgt zum Abschluss durch Zugabe von 200 µl des Elution-Puffers AE (*QIAmp® DNA Mini Kit*) auf die Spin-Säule. Diese wird im Reaktionsgefäß eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, kann verworfen werden und die reine DNA in 200 µl Pufferlösung verbleibt im Reaktionsgefäß [114].

#### 3.3.1.1 Geräte

- Mikrozentrifuge (Eppendorf)
- Thermomixer (Eppendorf) für 1,5ml Eppendorfröhrchen
- Steril-Werkbank (HeraSafe)
- Diverse Kolbenhubpipetten (Eppendorf Research)
- Handschuhe
- Aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Diverse Reaktionsgefäße
- Spektrophotometer „NanoDrop“ (PeqLab)

#### 3.3.1.2 Reagenzien

- QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen) Artikel Nr. 51306
- Äthanol puriss
- steriles bidestilliertes Wasser

### 3.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Qualität der DNA wurde mithilfe des Spektralphotometers (*NanoDrop*) der Firma *PeqLab* gemessen. Es wird gemessen, wieviel Licht der Wellenlänge 260nm von den Nukleinsäuren der Probe absorbiert und wieviel durchgelassen wird. Daraus kann die Konzentration der Nukleinsäure nach folgender Formel berechnet werden:

$c (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} * V * F$	OD (Optische Dichte) <sub>260</sub> = Extinktion bei 260 nm
	V = Verdünnungsfaktor
	F = Umrechnungsfaktor

Der Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA beträgt 50, womit die DNA-Konzentration berechnet werden kann [100]:

$OD_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$
--

Proteine, Phenol und andere kontaminierende Stoffe absorbieren hingegen Licht der Wellenlänge 280 nm. Um den Reinheitsgrad der DNA zu messen, wird der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gebildet. Ein Wert von ~1,8 deutet auf eine reine DNA hin.

Bevor gemessen werden kann, muss das Spektralphotometer mit 1,5 µl destilliertem Wasser initialisiert werden. Es folgt eine Leerwertaufnahme mit der Substanz, in der die DNA gelöst ist, welche in unseren Fällen ebenfalls destilliertes Wasser ist. Dies ergibt den Nullwert, sodass alle darüberliegenden Werte die reine DNA anzeigen. Nun wird das Programm *Nano Drop 1000 Version 3.8.1* und damit die Messung gestartet, indem jeweils 1,5 µl DNA einer Probe auf den Messbereich des Geräts pipettiert wird [151].

### 3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein häufig verwendetes Verfahren der Molekularbiologie, um ein bestimmtes DNA-Fragment *in vitro* millionenfach zu vervielfältigen, mit dem Ziel dieses näher zu charakterisieren. Sie gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Schritte, die sich in ihrem Temperaturprofil voneinander unterscheiden. Die drei Schritte wiederum werden zyklisch 30 bis 40 mal wiederholt und amplifizieren somit exponentiell das gewünschte DNA-Fragment mit jedem Zyklus [64].

Der Thermocycler *C1000 Touch™* und folgende Materialien werden benötigt: DNA-Matrize, zwei Oligonukleotid-Primer (einzelnsträngige DNA-Stücke, 12-50 Nukleotide lang), thermostabile Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) und eine Mischung aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Der erste Schritt ist die *Denaturierung* des zu vervielfältigenden DNA-Doppelstrangs, der Matrize. Bei 90-95°C spaltet er sich in zwei Einzelstränge. An diese lagern sich im zweiten Schritt bei etwa 55-60°C

die beiden Oligonukleotid-Primer an die jeweilige komplementäre DNA-Sequenz an, was dem Schritt den Namen *Annealing* verleiht. Sie grenzen das zu amplifizierende DNA-Fragment ein und werden von dem Enzym Polymerase als Startmolekül für den dritten Schritt, die *Elongation*, genutzt. Unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) werden die Primer bei 72°C verlängert und es entstehen zwei doppelsträngige DNA-Fragmente, die im darauffolgenden Zyklus wieder als Matrizen dienen. Die Kopienanzahl der Sequenz verdoppelt sich somit in jedem Zyklus, sodass nach 30 PCR-Zyklen bereits etwa eine Milliarde Kopien vorliegen ( $2^{30}$ ) [64].

### 3.3.4 Allelische Diskriminierung

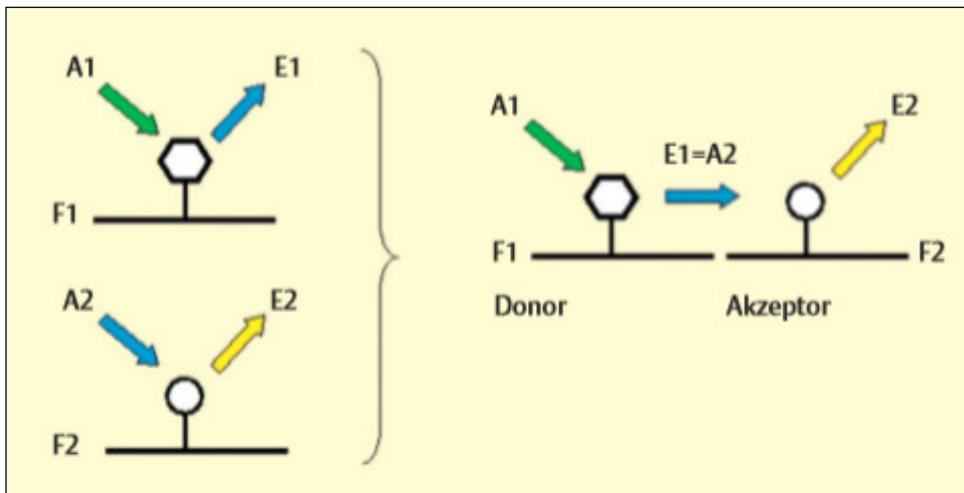
#### 3.3.4.1 Erläuterung der Methodik

Eine Methode, um in Patientenblutproben Polymorphismen zu detektieren, ist die allelische Diskriminierung mittels TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays. Die vorliegende DNA-Matrize eines Patienten soll dahingehend untersucht werden, ob das Wildtyp-Allel oder das mutierte Allel vorhanden ist und ob es sich um einen homozygoten oder heterozygoten Träger handelt.

In dieser Studie wurde die qualitative Endpunktmessung der Real-Time-PCR mithilfe einer vorgefertigten TaqMan®-Sonde genutzt. Sie ist eine Oligonukleotidsonde mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem sogenannten Quencher-Farbstoff und dem Minor Groove Binder (MGB) am 3'-Ende. Sie ist komplementär zu der gesuchten Zielsequenz und bindet wie Primer an diese. Es gibt zwei Arten von Reporter-Farbstoffen: VIC™ und FAM™, die dem gesuchten Allel zugeordnet werden. Der MGB bindet an eine kleine Furche der DNA und erhöht somit die Schmelztemperatur der Sonde. Das verstärkt die Bindung zur Zielsequenz und bietet die Möglichkeit, eine kurze Sondenlänge zu verwenden, die spezifisch zum gesuchten SNP ist.

Der Reporter-Farbstoff fluoresziert jedoch nur unter bestimmten Bedingungen: Solange er sich in räumlicher Nähe zum Quencher-Farbstoff befindet, wird seine abgegebene Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) ausgelöscht, was dem Quencher seinen Namen gibt (engl. *quencher* = Löscher). Der FRET funktioniert folgendermaßen: Jeder Farbstoff benötigt eine Anregungswellenlänge (A) und besitzt ein bestimmtes Emissionspektrum (E). In der folgenden Abbildung 3 soll F1 als Reporter-Farbstoff und F2 als Quencher verstanden werden. Die Emissionsenergie des Reporters ist höher als die des Quenchers und wird bei der Anregung des Reporters auf das niedrigere Energielevel des Quenchers übertragen. Die Anregungsenergie der Quencher ist so auf die Emissionsenergie der Reporter abgestimmt, dass das Emissionspektrum des Reporters gleich dem Anregungsspektrum des Quenchers ist

und so in räumlicher Nähe die Emission des Reporters unterdrückt wird [21]. Zur besseren Veranschaulichung siehe Abbildung 3. Befinden sich die beiden Farbstoffe nicht in räumlicher Nähe zueinander, tritt kein Energietransfer auf und der Reporter-Farbstoff leuchtet, ohne an Stärke zu verlieren.



**Abbildung 3:** Fluoreszenzmessung durch Energietransfer [21]

Die Real-Time PCR läuft in den bekannten drei Schritten ab, die hier in 40 Zyklen wiederholt werden. Sie beginnt mit der Denaturierung der DNA-Matrize in zwei Einzelstränge bei 95°C. Während des Annealing lagern sich die Vorwärts- und Rückwärtsprimer an den Enden der gesuchten Sequenz an und dienen der Taq-DNA-Polymerase als Startsequenz zum Aufbau des Komplementärstranges. Die TaqMan®-Sonde hybridisiert nun mit der Sequenz des gesuchten SNPs. Die Taq-DNA-Polymerase hat eine zweite Schlüsseleigenschaft, die im weiteren Verlauf genutzt wird: die 5'-Exonukleaseaktivität. Diese Eigenschaft besagt, dass sie die Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotids und der benachbarten 3'-Hydroxylgruppe des nächsten Nukleotids hydrolytisch spaltet, während sie den fehlenden DNA-Abschnitt neu synthetisiert [6]. Trennt nun die Taq-DNA-Polymerase während des dritten Schritts der Elongation bei 72°C den Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff, kann die Emission des Reporters ansteigen. Es werden nur Sonden gespalten, die an die Zielsequenz komplementär gebunden sind, sodass anhand des erzeugten Fluoreszenzsignals (hier VIC™ und FAM™) analysiert werden kann, welches Allel sich in der Probe befindet. Das sterile Wasser dient der Negativprobe und als Positivprobe für jedes Allel dienen PCR-Produkte von Plasmiden, in die das entsprechende PCR-Produkt hinein kloniert wurde. Die folgende Abbildung 4 zeigt schematisch den Ablauf eines TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays:

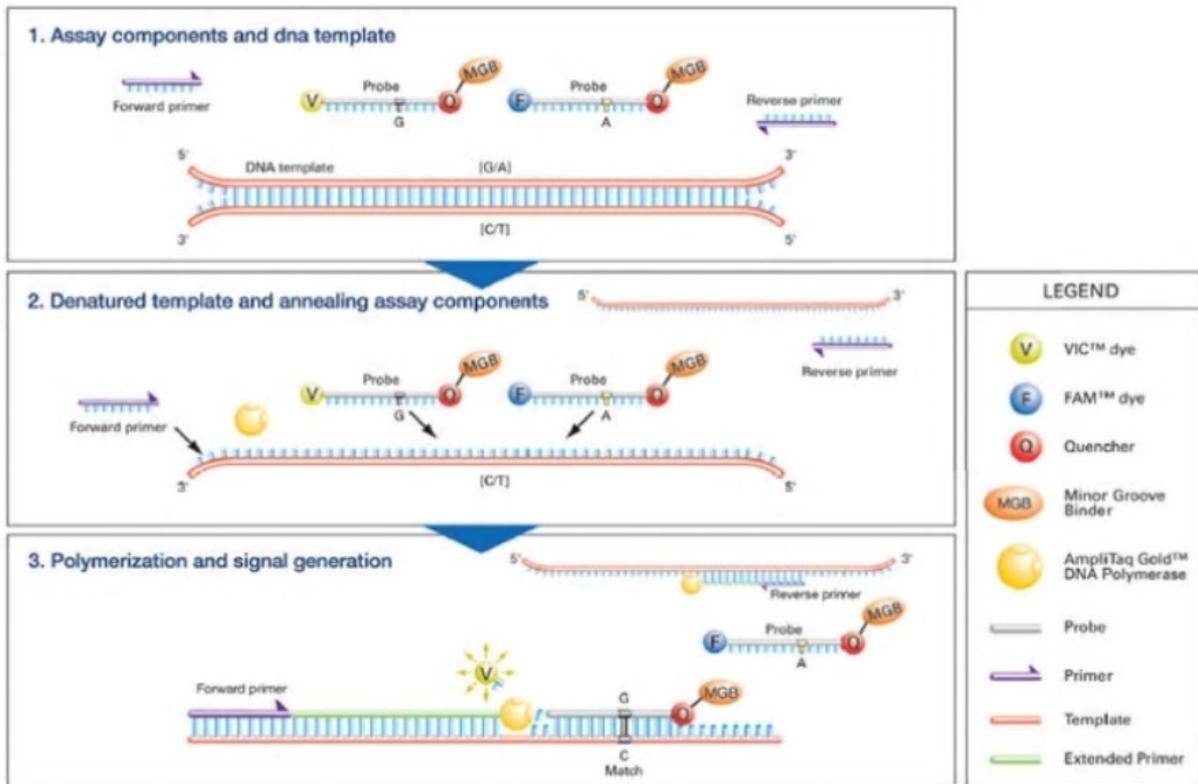


Abbildung 4: Ablauf eines TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays [46]

### 3.3.4.2 Geräte

- TaqMan® Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems)
- Tischzentrifuge (Eppendorf)
- Plattenzentrifuge (Sigma)
- Diverse Kolbenhubpipetten (Eppendorf research variable)
- PCR-Platten und Verschlussfolien (DNase und RNase frei)
- Aerosolgeschützte Pipettenspitzen
- Diverse Reaktionsgefäße (DNase und Rnase frei)

### 3.3.4.3 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für einen Ansatz des *TaqMan*® Genotypisierungsassays genutzt:

Tabelle 4: Reagenzien für einen Ansatz des TaqMan-Genotypisierungsassays

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
2x TaqMan® GTXpress Master Mix (Applied Biosystems) enthält:	1x	2,5

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puffer</li> <li>- dNTPs</li> <li>- Referenzfarbstoff</li> <li>- AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase</li> </ul>		
40x Genotyping Assay (Applied Biosystems) enthält: <ul style="list-style-type: none"> <li>- zwei unmarkierte Primer (Vorwärts + Rückwärts)</li> <li>- TaqMan-Sonde mit FAM + Quencher + MGB</li> <li>- TaqMan-Sonde mit VIC + Quencher + MGB</li> </ul>	1x	0,125
DNA	10-50ng	1,0
Steriles Wasser		1,375

Die Angaben gelten für 5µl Ansätze (1µl DNA + 4µl Mastermix). Die Lösungen werden in ein DNase und RNase freies Reaktionsgefäß pipettiert.

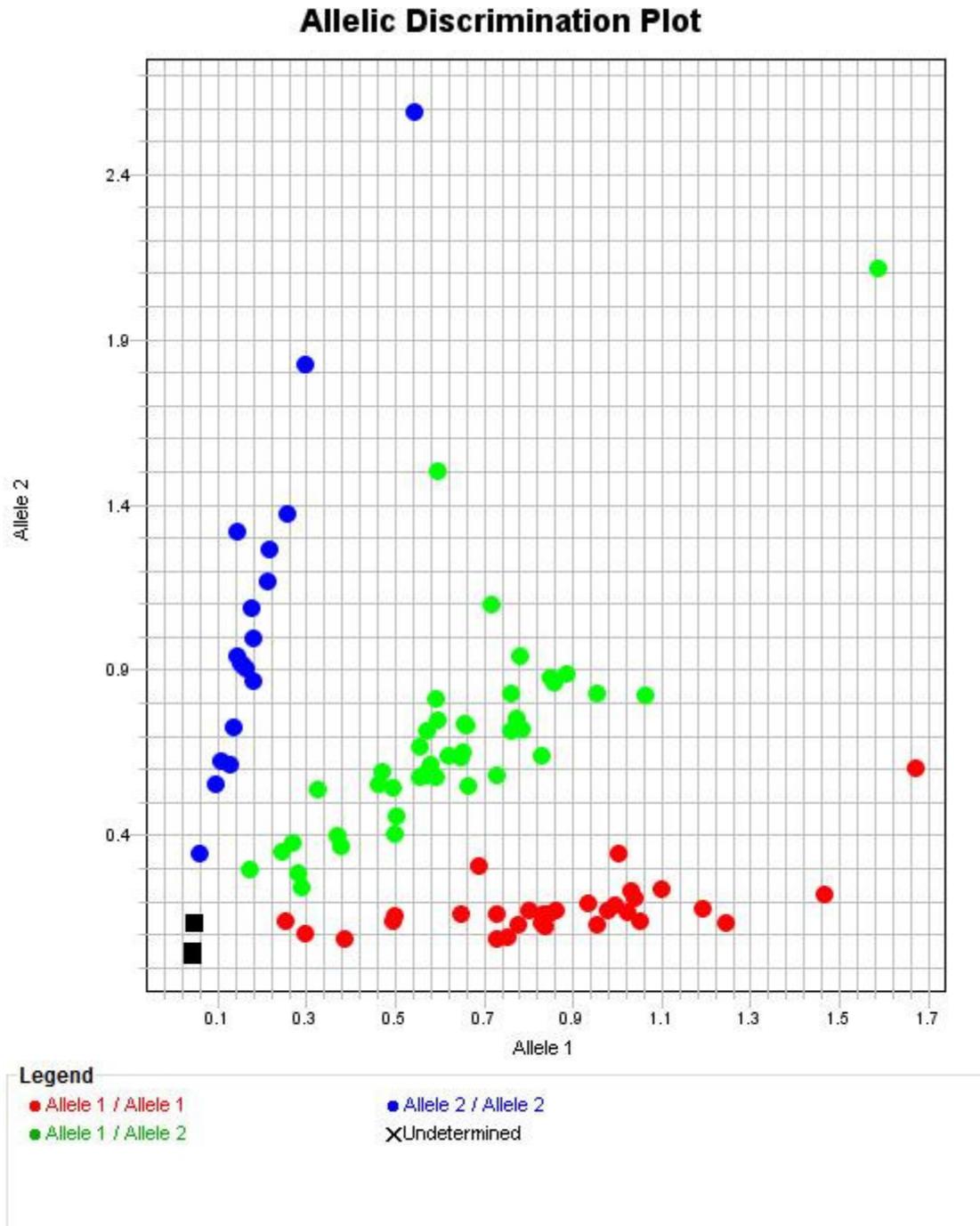
Folgender Temperaturverlauf der PCR wurde verwendet:

**Tabelle 5:** PCR-Programm für Allelische Diskriminierung

Schritt	Temperatur/Zeit
Pre Read (Messung der Ausgangs Fluoreszenz)	25°C/1 min
Aktivierung AmpliTaq Gold	95°C/20 sec
Amplifikation	Amplifikation 30 Zyklen (60°C/30sec)
	95°C/3 sec
Post Read (Messung der End-Fluoreszenz)	25°C/1min

### 3.3.4.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte über die 7500 FAST 2.0.4 Software (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Plot der allelischen Diskriminierung am Beispiel der Genotypisierung der Kontrollgruppen des SNPs im *MBOAT7*-Gen. Blau zeigt die Mutante (FAM<sup>TM</sup>-Farbstoff), Rot den Wildtyp (VIC<sup>TM</sup>-Farbstoff) und Grün die heterozygoten Proben.

### 3.3.5 Sanger-Sequenzierung

Die AB0-Blutgruppen der Studienteilnehmer wurden anhand dreier SNPs bestimmt, wie es von Ellinghaus et al. [32] durchgeführt wurde. Von der Firma *ThermoFisher* wurden die spezifischen Primer und Reagenzien für eine DNA-Sequenzierung nach Sanger bestellt, womit die Bestimmung der Nukleotidfolge der Patienten-DNA per Kettenabbruchmethode vollzogen werden konnte. Die Primer wurden vorher selbst mit dem Programm *Primer 3* (Version 4.1.0) designt, welches auf der Website <http://primer3.ut.ee/> zur freien Verfügung steht [118].

#### 3.3.5.1 Erläuterung der Methodik

Die Methode des Biochemikers Frederick Sanger [99] erfolgte in teils modifizierten und automatisierten Schritten. Benötigt werden die zu sequenzierende DNA-Matrize, zwei Sequenzierprimer (Vorwärts und Rückwärts), DNA-Taq-Polymerase, Sequenzierpuffer, vier dNTPS (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) und die für jede Reaktion spezifischen ddNTP-Moleküle (2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat; ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Die ddNTPs sind mit je vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was den ursprünglichen Einsatz von radioaktiv markierten Molekülen obsolet macht.

Bevor die gelieferten Primer für die Sanger-Sequenzierung verwendet werden dürfen, wurden die optimale Bindungstemperatur und die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration mittels PCR an Testproben etabliert. Zu Beginn wird das zu sequenzierende DNA-Fragment in einer PCR mit dem spezifischen Primerpaar und den dNTPs amplifiziert. Im zweiten Schritt wird das Produkt erneut vervielfältigt, diesmal per BigDye Cycle-Sequencing. Das bedeutet, dass die vier ddNTPs mit gekoppelten Farbstoffen (*Big Dye*) der zweiten PCR hinzugefügt werden. Bei 96°C denaturiert das Template in zwei Einzelstränge, an die der spezifische Primer als Startmolekül für die DNA-Polymerase binden kann. Wird nun der neue DNA-Strang durch die Primerverlängerung der DNA-Taq-Polymerase komplementär zur DNA-Matrize synthetisiert, werden von ihr auch die ddNTPs eingebaut. Die fehlende OH-Gruppe am 3'-C-Atom verleiht ihnen die Eigenschaft eines Abbruchnukleotids, da nach ihrem Einbau in den DNA-Strang kein weiteres Nukleotid mehr angeknüpft werden kann. Es kommt zum Kettenabbruch. Aus diesem Grunde erhält man unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die am 3'-Ende mit einem ddNTP enden. Die Syntheseprodukte werden zur Auswertung mittels Kapillarelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Trennung nach Größe der Fragmente findet hierbei in einem dünnen Kapillarrohr in einer Elektrolytlösung statt, über die eine Hochspannung für den Trennvorgang zugeführt wird. Im elektrischen Feld bewegen sich Ionen mit einer konstanten Geschwindigkeit. Die DNA ist aufgrund ihrer Phosphatgruppe negativ geladen und wandert beim Anlegen einer Spannung in Richtung Anode. Lange DNA-Fragmente werden beim Wandern durch die Kapillare eher gehindert und sind daher langsamer als kürzere. Am Kapillarende registriert ein Detektor die nacheinander fluoreszierenden ddNTPs und zeichnet die Basensequenz auf [7].

### 3.3.5.2 Arbeitsschritte

#### ○ Etablierung der Primer

Die Primer wurden an einer bekannten DNA-Probe der Routinediagnostik überprüft. Um die geeignete Menge an  $MgCl_2$  auszumachen, wurden jeweils zwei Ansätze pipettiert, die sich nur in ihrer Menge an verwendetem  $MgCl_2$  unterschieden: Ansatz 1 mit 0,75  $\mu l$  50mM  $MgCl_2$ ; Ansatz 2 mit 1  $\mu l$  50mM  $MgCl_2$ .  $MgCl_2$  fungiert als Kofaktor für die Taq-Polymerase und hindert mit seinen positiv geladenen Magnesiumionen die negativen Phosphatgruppen der DNA daran, sich gegenseitig abzustößen. Somit erleichtert es den Primern, an die spezifische Lokalisation zu binden [132]. Die ideale Bindungstemperatur der Primer wird durch das Grading während der PCR genau bestimmt. Für beide Primer wird ein Temperaturbereich zwischen 59-67°C ausgewählt, welcher in acht Stufen unterteilt und durchlaufen wird (67°C; 66,5°C; 65,6°C; 64°C; 62,2°C; 60,9°C; 59,8°C; 59°C). Daraus ergeben sich acht Ansätze, die jeweils für beide Primer und für beide  $MgCl_2$  – Konzentrationen pipettiert wurden (4x8=32 Ansätze).

**Tabelle 6:** Reagenzien für einen Ansatz der PCR der Primeretablierung

Reagenzien	$\mu l$ für einen Ansatz
Steriles Wasser (Merck)	17,5
10x PCR Puffer	2,5
$MgCl_2$ 50mM	Ansatz 1: 0,75 Ansatz 2: 1
dNTPs 10mM jeweils	0,5
Primer F 10 $\mu$ M	0,5
Primer R 10 $\mu$ M	0,5
Taq-Polymerase	0,25
DNA	2,5

**Tabelle 7:** PCR-Programm der Primeretablierung

Schritt	Temperatur/Zeit
Denaturierung	94°C / 2min
Aktivierung Taq-Polymerase	94°C / 45sec
Gradient	59-67°C/ 30sec
Amplifikation 35 Zyklen	72°C / 45sec
Elongation	72°C / 5min
Ende	4°C / $\infty$

Jeder Ansatz wurde nach Beenden der PCR in einem 2%igen Agarosegel aufgetragen und bei 120V in einer Gel-Elektrophoresekammer 45min aufgetrennt. Ausgewertet wurde schließlich die Bandenstärke im Gel-Dokumentationsgerät und anhand der Software *FusionCapt Advance SL2 Xpress*.

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Primeretablierung

Primer	optimale Bindungstemperatur	optimale MgCl <sub>2</sub> - Menge
rs8176719	64°C	1µl
rs41302905 + rs8176747	64°C	0,75µl

- Herstellung der PCR-Reaktion

25µl Ansätze: 2,5µl DNA + 22,5µl Mastermix

**Tabelle 9:** Reagenzien für einen Ansatz der Sanger-Sequenzierung

Reagenzien	µl für einen Ansatz
10x PCR Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	Primer rs8176719: 0,75 Primer rs41302905 + rs8176747: 1
dNTPs	0,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Taq-Polymerase	0,25
Steriles Wasser (Merck)	Primer rs8176719: 17,25 Primer rs41302905 + rs8176747: 1
DNA	2,5

PCR-Programm mit optimaler Bindungstemperatur von 64°C

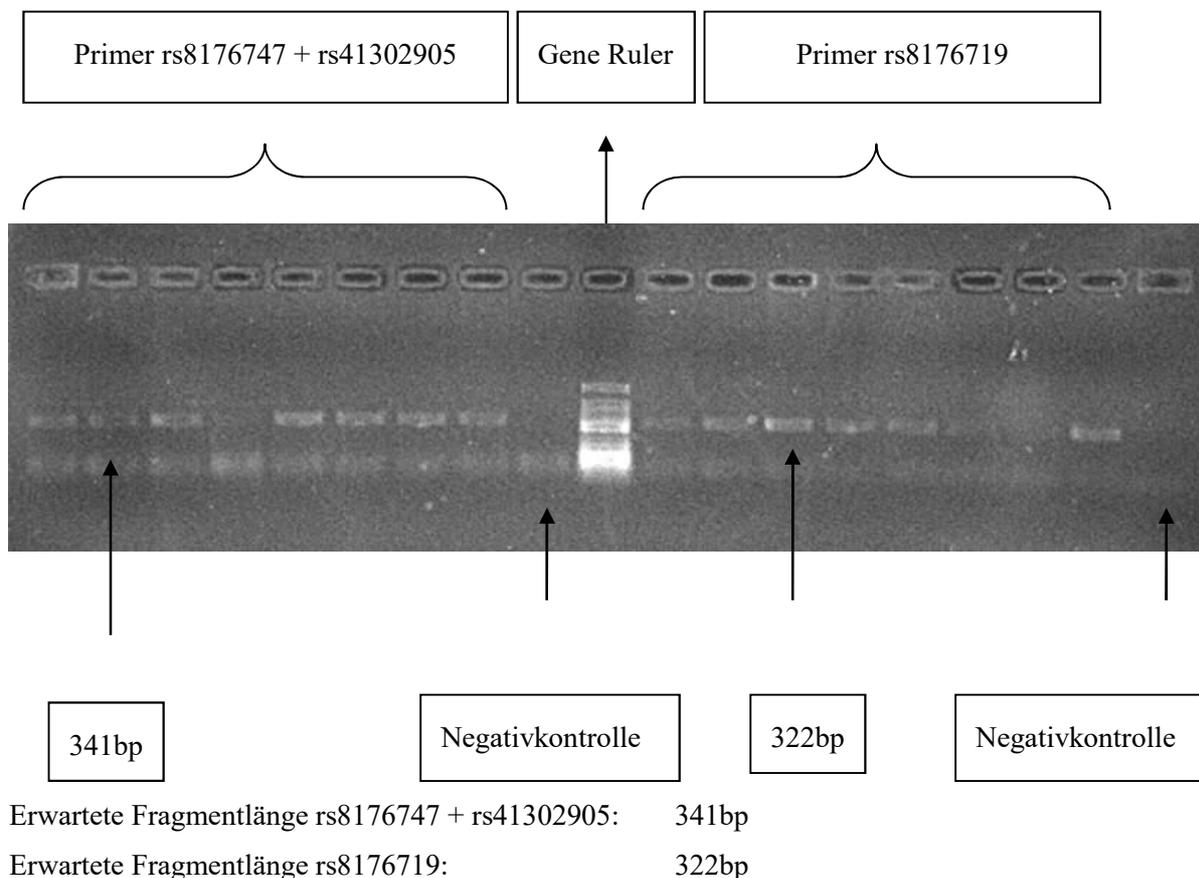
**Tabelle 10:** PCR-Programm der Sanger-Sequenzierung

Schritt	Temperatur/Zeit
Denaturierung	94°C / 2min
Aktivierung Taq-Polymerase	94°C / 45sec
Primer Bindung	64°C / 30sec
Amplifikation 35 Zyklen	72°C / 45sec
Elongation	72°C / 5min
Ende	4°C / ∞

- Kontrolle der PCR-Reaktion

Um zu überprüfen, ob ausreichend lange Fragmente in der PCR entstanden sind, trägt man 5µl des Produkts auf ein 2%iges Agarose-Gel auf und lässt es neben dem Längenmarker *GeneRuler 100bp* und

einer Negativkontrolle laufen. Bei 120V wird die Probe in einer Gel-Elektrophoresekammer 30min aufgetrennt und darauffolgend im Gel-Dokumentationsgerät mittels UV-Beleuchtung visualisiert und mit der Software *FusionCapt Advance SL2 Xpress* digitalisiert und ausgewertet.



**Abbildung 6:** Gelelektrophorese der PCR für die Sanger-Sequenzierung

- Aufreinigung der PCR-Reaktion

Die DNA wird vor der Weiterverwendung von einzelnen Nukleinsäuren und kontaminierenden Stoffen gereinigt, wofür sie in gleichen Anteilen mit dem PEG-Mix zusammengegeben und bei 13.000g zentrifugiert wird. Zur Ausfällung wird außerdem 100µl Ethanol hinzugegeben.

- Konzentrationsbestimmung am Nano Drop (s. Kapitel 3.3.2)

- Sequenzierungs-PCR

**Tabelle 11:** Reagenzien für einen Ansatz des BigDye Cycle-Sequencing

Reagenzien	Endkonzentration	µl für einen Ansatz
5x PCR-Puffer	0,5x	1
Primer	250nM	1

Big Dye		1
Steriles Wasser		6
Template		1

Sequenzierungs-PCR-Programm für 25 Zyklen

**Tabelle 12:** PCR-Programm des BigDye Cycle-Sequencing

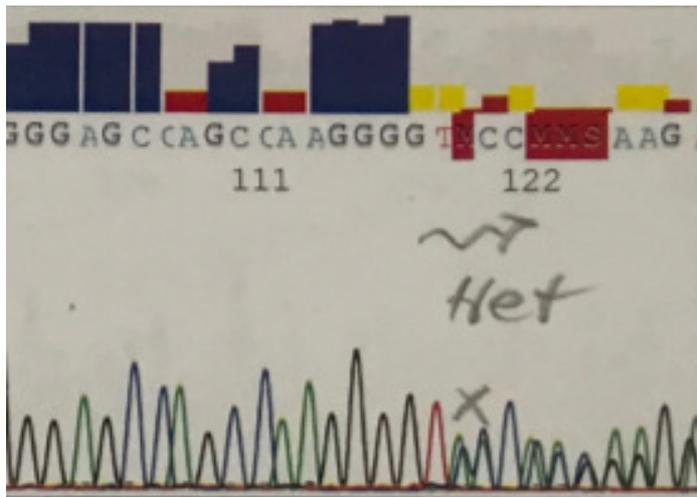
Temperatur / Zeit
96°C / 1min
96°C / 10sec
55°C / 5sec
60°C / 2min
4°C / ∞

- **Aufreinigung**

Das Sequenzierprodukt muss ebenfalls von kontaminierenden Stoffen gereinigt werden, wozu das *BigDye®XTerminator Kit* verwendet wird. Das Terminator-Kit beinhaltet Partikel, die an alle überschüssigen Basen und Primer binden. Die DNA bleibt nach dem Vortexen und Zentrifugieren somit als Überstand übrig und kann in 96-Well-Platten pipettiert werden.

- **Auswertung mittels Kapillarelektrophorese**

Im Sequenziergerät *SeqStudio Genetic Analyser* werden die DNA-Fragmente im letzten Schritt aufgetrennt und unter Verwendung des Programms *Sequencing Analysis Software Version 7* in die Basenabfolge übersetzt. Beispielhaft wird hier ein Elektropherogramm dargestellt, an dem sich der Genotyp ablesen lässt.



**Abbildung 7:** Elektropherogramm von rs8176719 zeigt die Heterozygotie des Allels an

### 3.3.5.3 Geräte

- SeqStudio Genetic Analyser (Applied Biosystems)
- Tischzentrifuge Eppendorf 5424
- Mini-Zentrifugen
- Vortexer (IKA Vortex Genius3; IKA Vortex VF2)
- Diverse Kolbenhubenpipetten (Eppendorf Research variable)
- 8er Streifen und Deckel
- Aerosolgeschützte Pipettenspitzen
- Probengefäße 0,2ml 8er Streifen
- Geldokumentationsgerät (Vilber Lourmat Peqlab FUSION SL)
- Elektrophoresekammer
- Spektralphotometer NanoDrop

### 3.3.5.4 Reagenzien

- Steriles Wasser
- Taq-Polymerase
- 10x PCR-Puffer –MgCl<sub>2</sub>
- 50µM MgCl<sub>2</sub>
- dNTPs (Thermo Scientific)
- Primer

rs8176719	F:ACCCCTCGGCCACCTCACTGA R:CCTCTGGTTGGTTTCCCGGGG
-----------	--

rs41302905 rs8176747	F:CCTTGGTGGGTTTGTGGCGC R:GGATTACCTGGTGTGCGTGGAC
-------------------------	--

- Big Dye Termination 1.1. Kit (Applied Biosystems): Big Dyes, 5x Sequenzier-Puffer, M13 Primer
- 10x Sequenzier-Puffer (Applied Biosystems)
- 6x Ladepuffer (Thermo Scientific)
- Größenstandard Gene Ruler 100bp (Thermo Scientific)
- Agarose (Biozym)
- BigDye®X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems)
- 100% Ethanol
- PEG-MIX-Lösung: 52,4g PEG 8000 Roth; 40ml 3M NaOAc pH5,2; 1,32ml 1M MgCl<sub>2</sub>; add 200ml steriles Wasser

### 3.4 Statistische Analysen

Die laborchemischen und klinischen Daten wurden in dem Programm Excel 2013 zusammengetragen und aufbereitet. Mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics Version 26 wurden sie auf Normalverteilung und Korrelation überprüft. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Für jedes Streudiagramm wurde ein Loess-Regressionsgraph erstellt (engl. *locally estimated scatterplot smoothing*; deutsch lokal gewichtete Streudiagrammglättung), der die Möglichkeit bietet, eine geglättete Kurve an alle Datenpunkte anzupassen. Punkte werden dabei unterschiedlich stark gewichtet, je nachdem wie weit sie jeweils auf der x- und y-Achse von einem Fokuspunkt entfernt sind. Somit kann die nicht-lineare zeitliche Abhängigkeit der Leberparameter übersichtlich mit ihren Ausreißerwerten dargestellt werden.

Der kategorische Vergleich der Leberwertveränderung nach klinischer Entwicklung wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven illustriert, die es ermöglichen, Häufigkeiten und zeitliches Auftreten der Parameterkonzentrationen im Log-Rank-Test zu vergleichen. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Prüfung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit einem exakten Test und die graphische Darstellung dessen in einem De Finetti-Diagramm wurde mit einer Software des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München durchgeführt (<https://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>) (Abbildung 37, S.78). Es handelt sich dabei um ein Ternärdiagramm, dessen Abszisse die Allelfrequenzen ( $p = 1-q$ ) und die Ordinate die Heterozyotenfrequenz zeigen. Die linke schräg verlaufende Achse präsentiert die Homozyotenfrequenz des Allels 1 und die rechte schräg verlaufende Achse die Homozyotenfrequenz des Allels 2. Jeder Populationszustand kann durch einen Punkt innerhalb des so entstandenen Dreiecks

dargestellt werden. Die durchgezogene Parabel verdeutlicht das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so dass Punkte, die auf oder in der Nähe dieser Parabel sind, Populationen im Gleichgewicht zeigen. Betrachtet man die blauen Linien, erschließt sich aus der Länge der vertikalen Linie die Heterozyotenfrequenz ( $=0,48$ ), aus der Länge der linken schrägen Linie die Homozyotenfrequenz von Allel 1 ( $A=0,21$ ) und aus der Länge der rechten schrägen Linie die Homozyotenfrequenz von Allel 2 ( $G=0,3$ ). Die Häufigkeit, mit der Allel 1 (A) in der gesamten Kohorte auftritt, kann an der x-Achse bei  $0,46$  abgelesen werden. Die Allelfrequenz für G ergibt sich folglich aus  $1-0,46 = 0,54$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientencharakteristika

Die Kohorte umfasst eine Anzahl von 61 Patienten, die zwischen dem 22. März 2020 und dem 6. Oktober 2020 aufgrund einer gesicherten SARS-CoV-2-Infektion hospitalisiert worden sind. 48 wurden am Universitätsklinikum Homburg auf der Station M-INF1 und/oder der Intensivstation (ICU) behandelt und 13 am Winterberg Klinikum Saarbrücken auf der Infektionsstation (Station 06) und/oder der dortigen Intensivstation (ICU). Die Altersverteilung entsprach der Normalverteilung. Das Alter aller Patienten lag zwischen 19 und 91 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter  $63 \pm 17$  Jahre betrug (Abbildung 8).

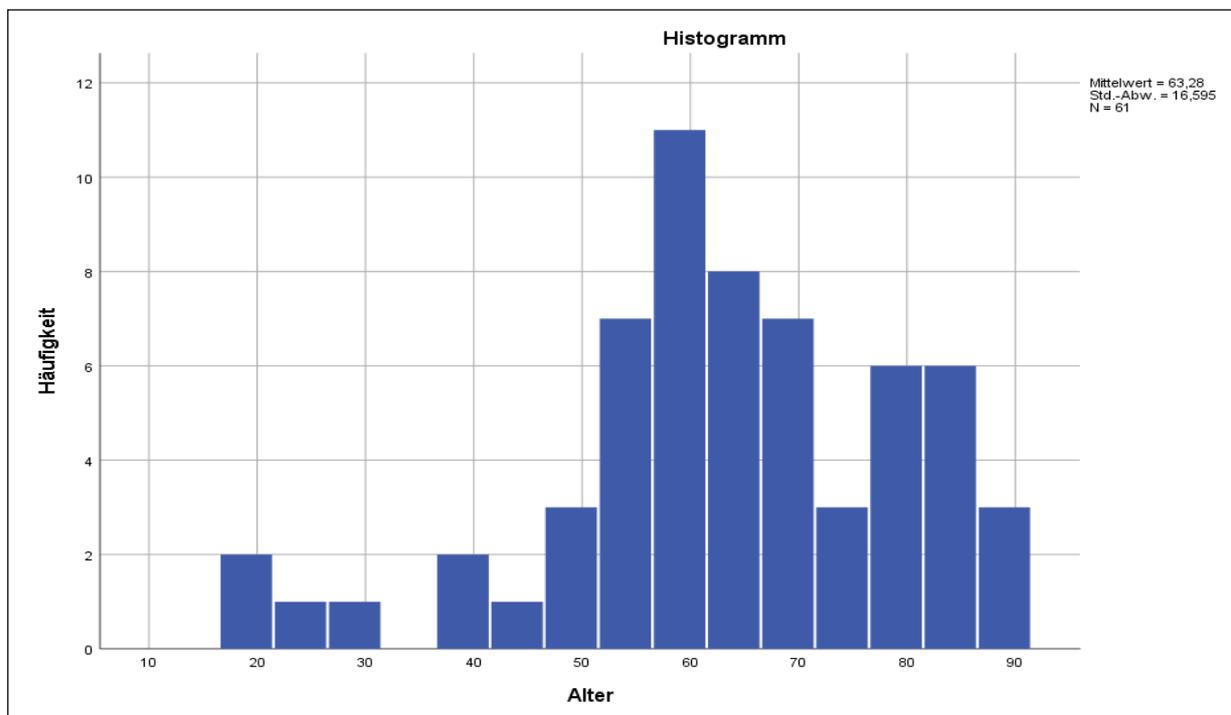
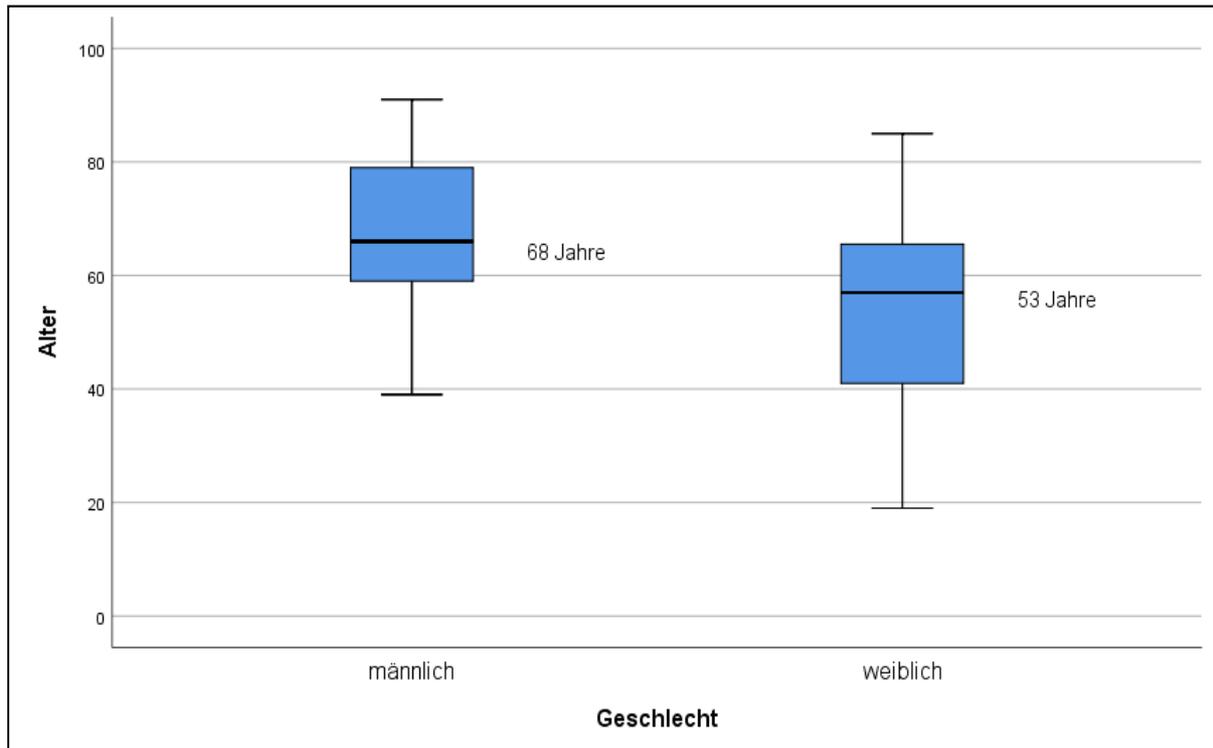


Abbildung 8: Altersverteilung der Kohorte

Unter den Patienten fanden sich 19 Frauen (31%) und 42 Männer (69%). Das durchschnittliche Alter der Frauen war mit 53 Jahren niedriger als das der männlichen Patienten mit 68 Jahren (Abbildung 9). Die Altersspannweite der Frauen erstreckte sich von 19 zu 85 Jahren und die der Männer von 39 zu 91 Jahren.



**Abbildung 9:** Altersverteilung nach Geschlecht

Die mediane Krankenhausaufenthaltsdauer betrug 15 Tage, mit einem Minimum bei einem Tag und einer maximalen Aufenthaltsdauer von 246 Tagen. Eine erneute stationäre Klinikaufnahme war bis zum Endzeitpunkt der Datenerfassung bei drei Patienten (5%) notwendig, welche aufgrund von Folgebeschwerden wie einem erneuten fieberhaften Infekt und hyperkapnischem respiratorischen Versagen bei Zustand nach COVID-19-Pneumonie wieder am Universitätsklinikum vorstellig wurden. Zwei von drei präsentierten bei Restationierung einen negativen SARS-CoV-2-Abstrich, während bei einem Patienten eine Reinfektion bei positivem Virusnachweis diagnostiziert wurde.

Insgesamt präsentierten sich bei Aufnahme mehr als die Hälfte der Patienten ( $35 \pm 57\%$ ) mit einer Herz-Kreislauf-Vorerkrankung, 14 (23%) mit Diabetes mellitus Typ 2 und keiner mit einer diagnostizierten Lebererkrankung. Es wurde mittels *t*-Test überprüft, ob die Länge des Krankenhausaufenthaltes mit Risikofaktoren der Patienten assoziiert ist. Die Auswertung zeigt mit *p*-Werten über 0,05 keine Korrelation, weder zum Geschlecht, zum Alter, zu Herz-Kreislauf-Vorerkrankungen noch zu AB0-Blutgruppen.

Um den Schweregrad der Erkrankung und das Outcome der Patienten zu analysieren, wurde erfasst, ob sie im Verlauf eine COVID-19-Pneumonie entwickelten (entspricht der „Pulmonary Phase“; s. Abbildung 2), ob sie eine intensivmedizinische Therapie benötigten, von einer invasiven Beatmung und/oder einer ECMO-Therapie versorgt werden mussten und ob sie während ihrer Hospitalisierung verstarben. Bei 41 Patienten (67%) wurde zu Beginn oder im Verlauf eine COVID-19-Pneumonie diagnostiziert, wobei 28 Patienten (46%) auf der Intensivstation behandelt wurden. Dort wurden 24 Patienten (39%)

invasiv beatmet und 9 (15%) mithilfe der ECMO therapiert. Während des Hospitalisierungszeitraums verstarben 14 Patienten (23%).

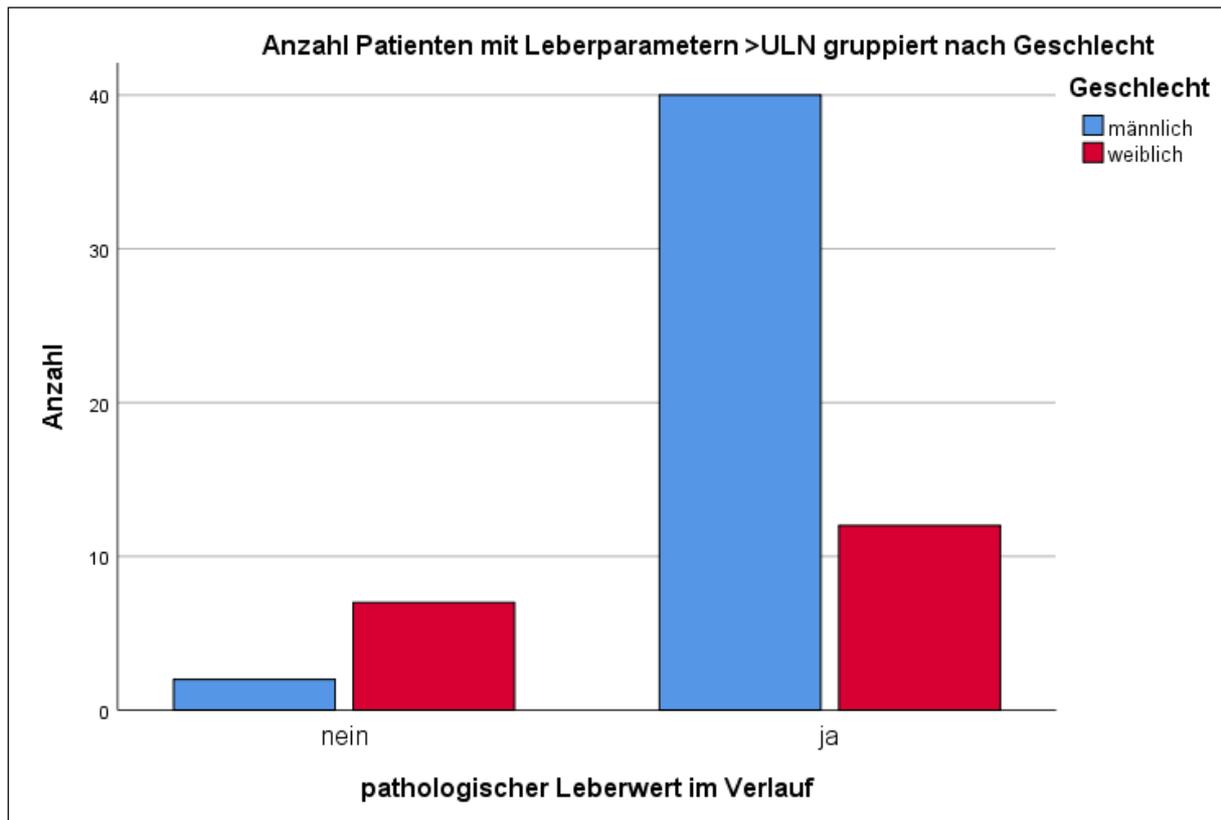
Die gesamte Kohorte wurde nach Alter unterteilt, wobei die Grenze bei  $\leq 65$  Jahre gewählt wurde, um die klinischen Daten der Patienten dieser Studie mit denen anderer Studien vergleichen zu können [95]. 35 Patienten (57 %) waren jünger als 65 Jahre oder exakt 65 Jahre alt und 26 Patienten (43%) waren älter als 65 Jahre. Mit einem p-Wert von 0,017 des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Alter von über 65 Jahren und dem Versterben. Die Letalität der Patienten älter als 65 Jahre liegt mit 39% deutlich höher als die Letalität der Jüngeren mit 11%. Keine signifikante Assoziation findet sich indes zwischen dem Alter und der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, einer intensivmedizinischen Behandlung, einer invasiven Beatmung oder einer ECMO-Therapie.

Analysiert wurde außerdem die Korrelation zwischen Versterben und dem Schweregrad der Erkrankung mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson. Signifikant korreliert die Behandlung auf der Intensivstation mit dem Versterben ( $p = 0,001$ ). Die Letalität der Patienten mit COVID-19 auf der ICU wird mit 43% angegeben (12 Verstorbene auf der ICU / 28 Gesamtzahl auf der ICU), während die Letalität von Patienten auf der normalen Infektionsstation 6% beträgt (2 Verstorbene auf der Infektionsstation / 33 Gesamtzahl auf Infektionsstation). Ebenfalls signifikant ist die Korrelation zwischen der Notwendigkeit einer invasiven Beatmung und dem Versterben der Patienten ( $p = 0,001$ ). Die Letalität beatmeter Patienten beträgt 46% (11 invasiv beatmete Verstorbene / 24 insgesamt invasiv Beatmete). Des Weiteren ist eine signifikante Korrelation zwischen einer ECMO-Therapie und dem Versterben zu sehen ( $p = 0,024$ ). Die Letalität der Patienten mit einer ECMO-Therapie liegt bei 56% (5 Verstorbene während einer ECMO-Behandlung / 9 Patienten insgesamt unter ECMO-Behandlung), während die Letalität 17% unter den Patienten beträgt, die keine ECMO-Therapie bekamen (9 Verstorbene ohne ECMO-Therapie / 52 Patienten gesamt ohne ECMO-Therapie). Nicht beatmete Patienten zeigen indes eine Letalität von 8% (3 nicht beatmete Verstorbene / 37 insgesamt nicht beatmete Patienten). Anzumerken ist hierbei, dass zwei Patienten lebensverlängernde Maßnahmen und eine Intubation ablehnten, sodass bei ihnen ein palliatives Therapiekonzept festgelegt wurde. Keine Korrelationen zeigen sich zwischen dem Versterben und Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, einer Herz-Kreislauf-Vorerkrankung, einem vorbestehenden Diabetes mellitus Typ 2 und dem Geschlecht.

## 4.2 Leberparameter

Ob bereits bei stationärer Aufnahme der Patienten in das Krankenhaus ein pathologischer Leberwert vorlag, wurde definiert als Überschreiten des ULN von mindestens einem Leberparameter AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, ALB und INR und als nominale Variable hinzugefügt. Dies ermöglichte einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Leberbeteiligung zum Krankheitsbeginn und Risikofaktoren sowie dem Schweregrad des COVID-19-Verlaufs mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson zu untersuchen.

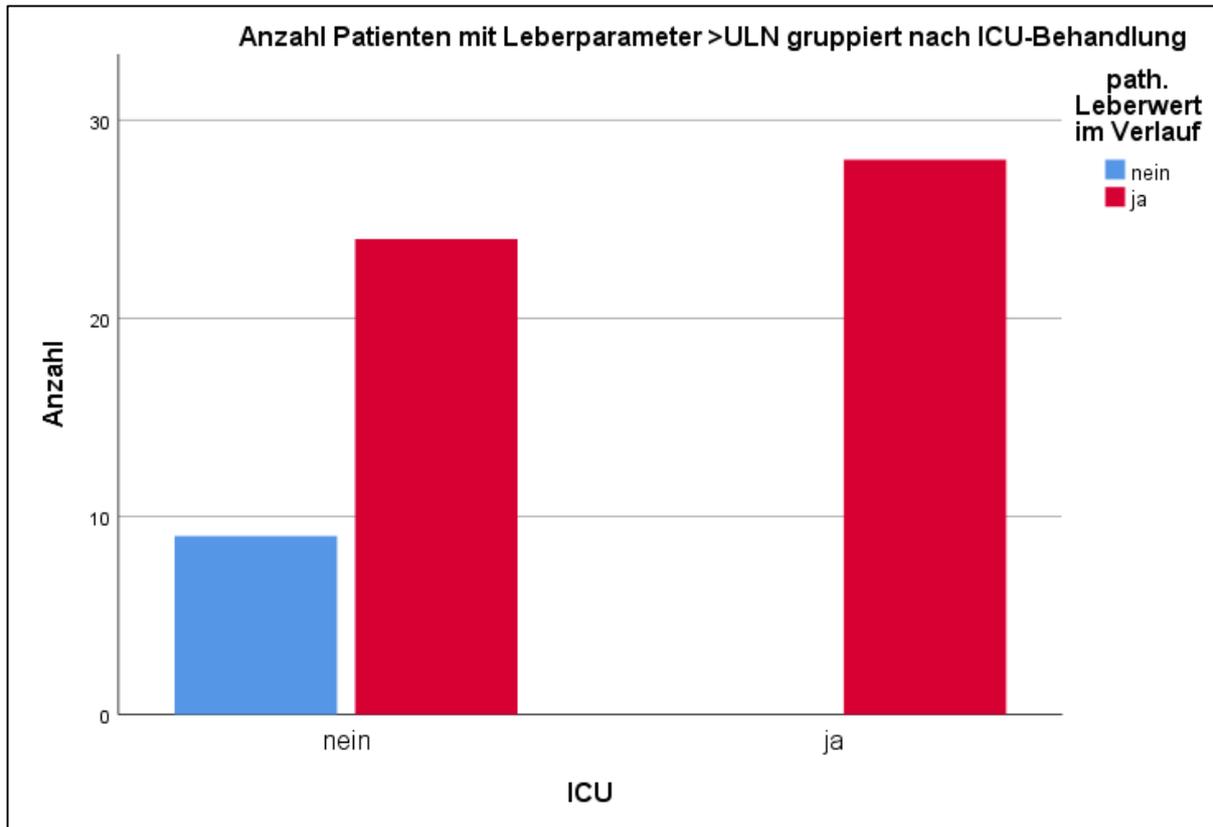
Insgesamt präsentierten sich bei Aufnahme 44 Patienten (72%) mit pathologisch erhöhten Leberparametern. Dieser Hinweis auf eine frühe Leberbeteiligung korreliert signifikant mit dem Geschlecht ( $p = 0,32$ ), wobei 34 Männer (81%) im Gegensatz zu 10 Frauen (53%) Leberwerte über dem oberen Grenzwert hatten. Ebenfalls signifikant ist die Korrelation zu der Aufnahme auf die intensivmedizinische Station ICU ( $p = 0,009$ ). 25 der 28 Patienten auf der ICU (89%) zeigten bereits bei Aufnahme pathologische Leberwerte, im Gegensatz zu 19 von 33 Patienten auf der normalen Infektionsstation (58%). Außerdem konnte eine Assoziation zwischen der Notwendigkeit einer invasiven Beatmung und erhöhten Leberparametern über ULN bei Aufnahme gefunden werden ( $p = 0,42$ ). 21 der 24 beatmeten Patienten (88%) stehen hierbei den 23 der 37 nicht beatmeten Patienten (62%) mit einer initialen Leberbeteiligung gegenüber. Keine Korrelationen finden sich indes zu der Krankenhausaufenthaltsdauer, dem Alter, einer vorbestehenden Herz-Kreislauf-Vorerkrankung oder einem Diabetes mellitus Typ 2, der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, einer ECMO-Therapie oder dem Versterben.



**Abbildung 10:** Anzahl der Patienten mit Leberparametern >ULN, gruppiert nach Geschlecht

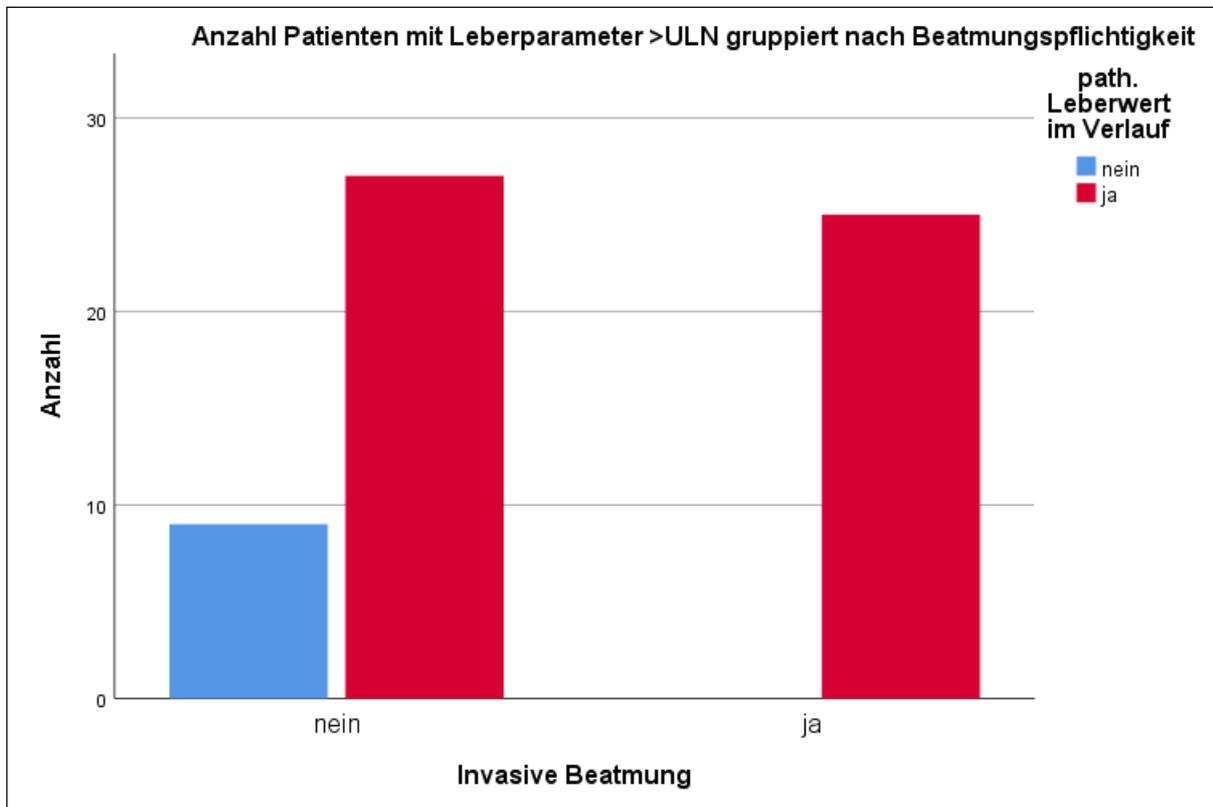
Da der Krankheitsverlauf im Fokus dieser Arbeit steht, wurde ebenfalls aufgezeichnet, bei wievielen Patienten mindestens ein Leberparameter im gesamten Krankenhausverlauf über den oberen Grenzwert anstieg. Insgesamt kam es bei 52 Patienten (85%) zu einem Überschreiten des ULN eines der Parameter AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, ALB und INR. Verglichen wurde daraufhin die Korrelation zu Risikofaktoren und Schweregrad der Erkrankung mit pathologischen Leberwerten bei Aufnahme oder im Gesamtverlauf. Das Vorliegen einer Leberbeteiligung per se korreliert ebenfalls mit dem Geschlecht ( $p = 0,003$ ). 40 Männer (95%) stehen 12 Frauen (63%) mit auffälligen Werten gegenüber (Abbildung 10).

Bezüglich der Frage einer Korrelation der initialen Leberparametererhöhung mit der Aufnahme auf die intensivmedizinische Station, so findet sich eine Assoziation zwischen der Parametererhöhung im Verlauf und einer ICU-Behandlung ( $p = 0,003$ ). Mit Blick auf die Abbildung 11 ist die Verschiebung deutlich: Alle 28 Patienten (100%), die auf der ICU behandelt wurden, präsentierten Zeichen einer Leberbeteiligung. Dem gegenüber stehen 24 von 33 Patienten (72%) mit einer Hepatopathie auf der Infektionsstation.



**Abbildung 11:** Anzahl der Patienten mit pathologisch erhöhten Leberparametern im Verlauf gruppiert nach ICU-Aufenthalt

Übereinstimmend zur Untersuchung der initialen Leberbeteiligung ist zu sehen, dass ein Zusammenhang zwischen pathologisch erhöhten Leberwerten im Verlauf und der Notwendigkeit einer invasiven Beatmung besteht ( $p = 0,008$ ). Alle der 25 beatmeten Patienten (100%) präsentierten erhöhte Leberwerte (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Anzahl der Patienten mit pathologisch erhöhten Leberparametern im Verlauf gruppiert nach Beatmungspflichtigkeit

Kein Zusammenhang besteht indes zu der Krankenhausaufenthaltsdauer, der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, der ECMO-Therapie, dem Versterben oder dem Alter.

#### 4.2.1 Leberparameter im Verlauf (Loess-Regressionsgraphen)

Ein Ansatz der graphischen Darstellung der kontinuierlichen Veränderung der Leberparameter ist die kumulative Analyse aller Werte eines Parameters in einem Streudiagramm. Auf der Ordinate sind jeweils die Laborwerte in ihren Einheiten logarithmisch skaliert aufgetragen. Die Abszisse zeigt bei jedem Diagramm die Zeit in Tagen an, die die Patienten am UKS oder am Klinikum Saarbrücken stationär behandelt wurden. Ein Punkt in dem Diagramm repräsentiert einen Wert zu dem Tag, an dem er im Zentrallabor des UKS bestimmt worden ist. Die verschiedenen Farben zeigen die 61 unterschiedlichen Patienten an, die auf der rechten Seite in der Legende abgelesen werden können.

Für jede Punktwolke wurde zusätzlich ein Loess-Regressionsgraph erstellt, der die Möglichkeit bietet, eine Kurve an die Datenpunkte anzupassen, indem die Punkte unterschiedlich stark gewichtet werden. Somit kann die nicht-lineare Beziehung zwischen den Laborparametern und dem Aufenthaltstag auch mit ihren Ausreißerwerten dargestellt werden. Tabelle 13 listet zur Orientierung und Einordnung der Werte die geschlechtsspezifischen Referenzbereiche des UKS-Zentrallabors auf:

**Tabelle 13:** Referenzbereiche der Laborparameter nach Angaben des UKS-Zentrallabors (geschlechtsspezifische Abweichungen sind fett markiert)

Parameter	♂	♀
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	10-50	<b>10-35</b>
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	10-50	<b>10-35</b>
Alkalische Phosphatase (AP) [U/l]	40-129	<b>35-104</b>
$\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) [U/l]	<60	<b>&lt;40</b>
Bilirubin gesamt (TBIL) [mg/dl]	<1,2	<1,2
Albumin (ALB) [g/l]	35-52	35-52
International Normalized Ratio (INR)	0,85-1,15	0,85-1,15
Laktatdehydrogenase (LDH) [U/l]	0-262	0-262
C-reaktives Protein (CRP) [mg/dl]	0,0-5,0	0,0-5,0
Interleukin 6 (IL-6) [pg/ml]	<7	<7

Abbildung 13 stellt den Verlauf der AST-Aktivitäten gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 978 Werte ausgewertet (Median 39 U/l; Streubreite 9-15205 U/l). Bereits zu Beginn des Hospitalisierungszeitraums liegt der Graph bei einem AST-Wert im Serum um > 50 U/l. In den ersten beiden Wochen steigt er leicht an und fällt danach konstant unter den ULN und bleibt im weiteren Verlauf im physiologischen Bereich. Auffällig sind in den ersten Wochen die dichte Punktvolke aufgrund der medianen Krankenhausaufenthaltsdauer von 15 Tagen und die Ausreißer mit Werten von über 10000 U/l von Patienten mit einem initial fulminanten Verlauf.

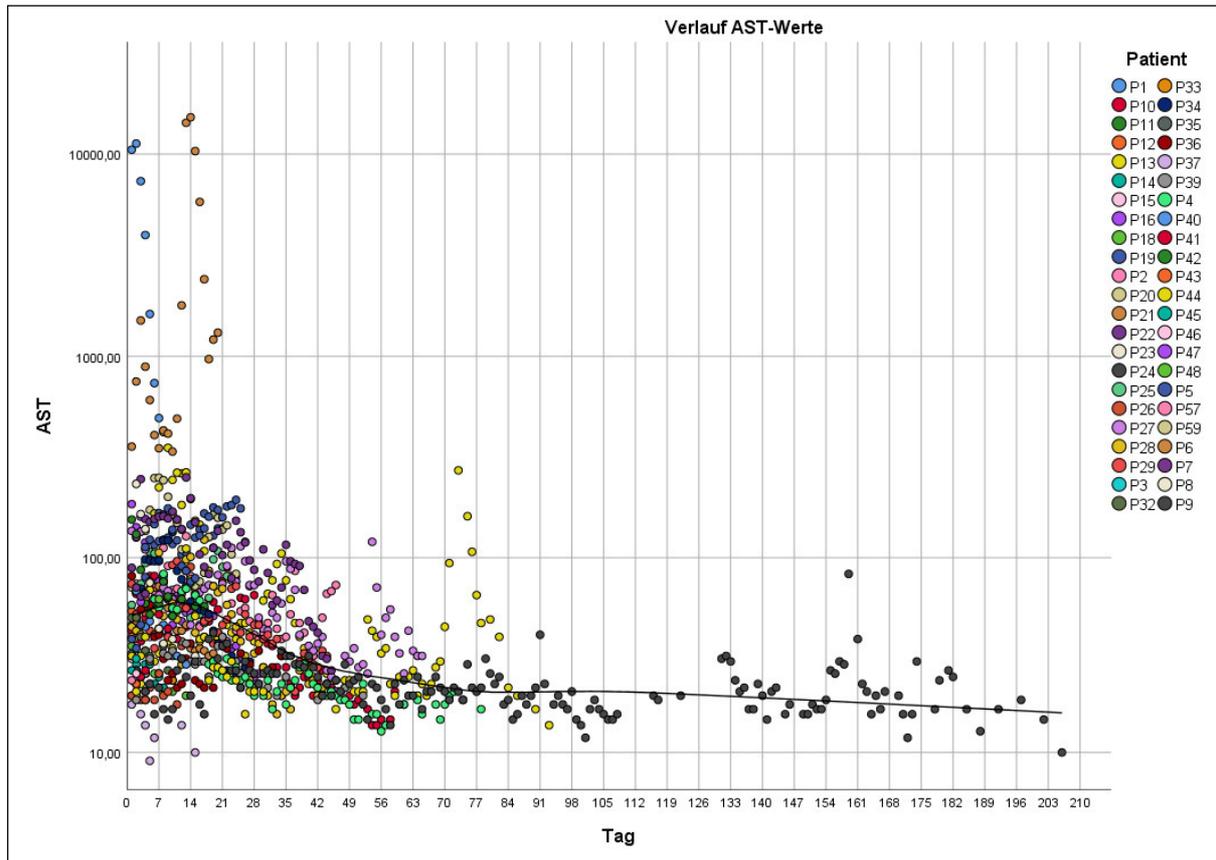
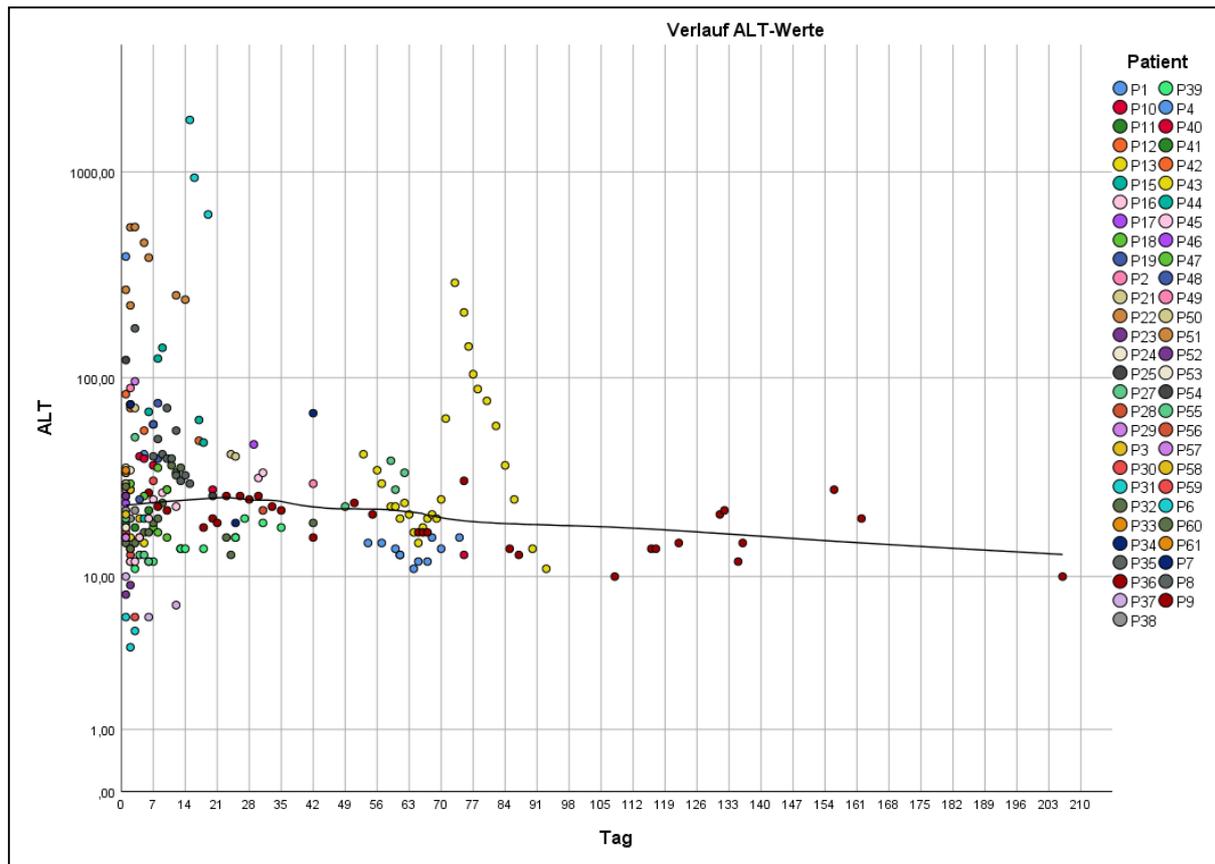


Abbildung 13: Verlauf der AST-Aktivitäten [U/l] von 46 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressiongraph

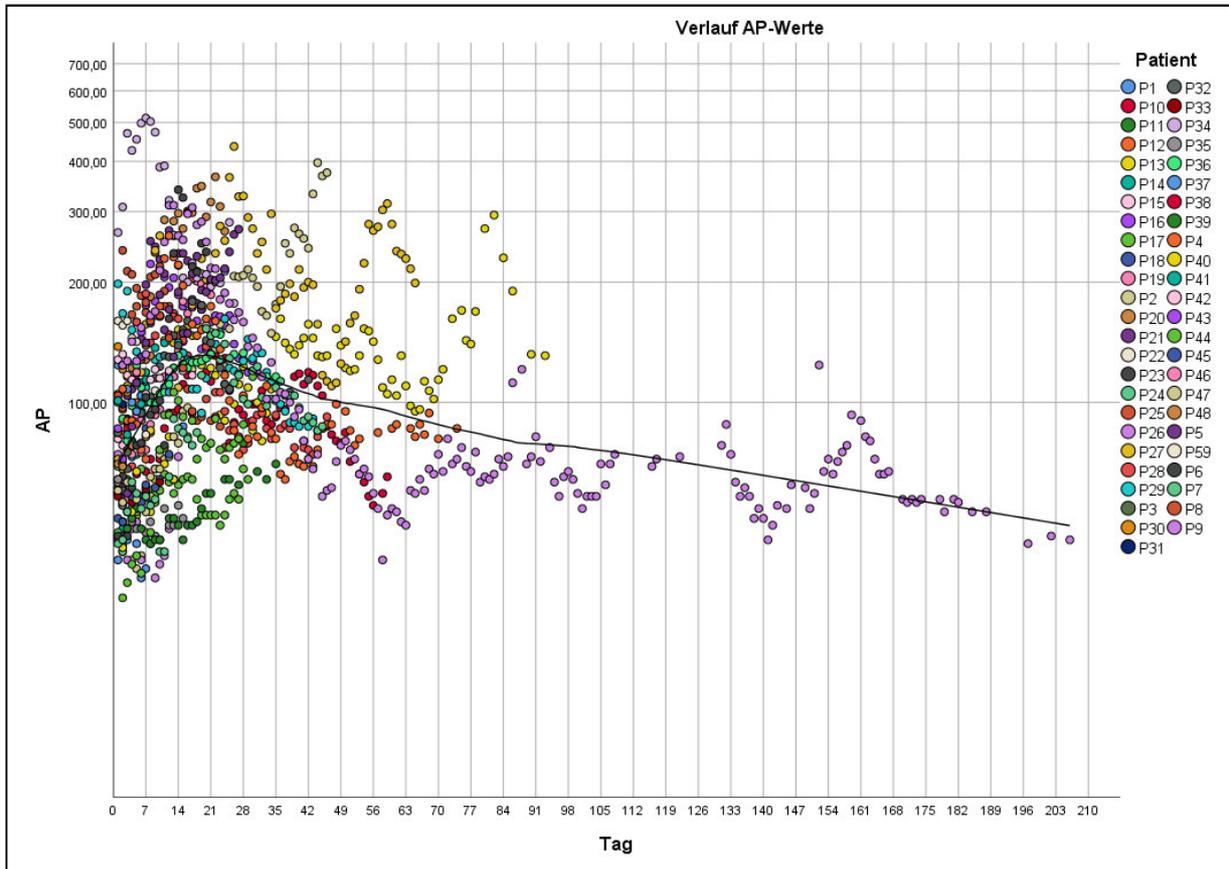
Abbildung 14 stellt den Verlauf der ALT-Aktivitäten gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 228 Werte ausgewertet (Median 23 U/l; Streubreite 4-1787 U/l).



**Abbildung 14:** Verlauf der ALT-Aktivitäten [U/l] von 61 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph

Das Enzym AST wird zwar vor allem in den Hepatozyten produziert, wird jedoch ubiquitär exprimiert und ist nicht leberspezifisch. Neben der Leber kommt es im Myokard, den Nieren und Skelettmuskeln vor, sodass eine Erhöhung auch bei Nekrosen der Herz- und Skelettmuskulatur messbar ist. ALT hingegen ist ein organspezifisches zytoplasmisches Enzym der Hepatozyten. Um herauszufiltern, ob die AST-Aktivität aufgrund einer Myositis oder von Herzmuskelschäden, die nicht selten während einer COVID-19-Erkrankung beobachtet worden sind, im Blut erhöht war, wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für AST- und ALT-Werte berechnet. Singulär am Aufnahmetag beträgt er 0,9 ( $p < 0,01$ ), und über den Gesamtverlauf zeigt sich ebenfalls eine starke positive Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,8 ( $p < 0,01$ ).

Abbildung 15 stellt den Verlauf der AP-Aktivitäten gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 1071 Werte ausgewertet (Median 101 U/l; Streubreite 32-513 U/l). Deutlich wird der steile Anstieg der AP-Konzentrationen über die ersten drei Wochen bis zum Konzentrationspeak nach 21 Tagen. Nach sieben Wochen fällt die Konzentration erstmals wieder unter den Median von 101 U/l und bleibt ab dann konstant im Normbereich.



**Abbildung 15:** Verlauf der AP-Aktivitäten [U/l] von 61 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph

Abbildung 16 stellt den Verlauf der  $\gamma$ -GT-Aktivitäten gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 1092 Werte ausgewertet (Median 86 U/l; Streubreite 4-904 U/l). Innerhalb der ersten zwei Wochen beschreibt die Konzentrationskurve einen steilen Anstieg auf das Zweifache des ULN. Der Peak wird in der dritten Woche erreicht, wonach sich die Konzentrationen langsamer, aber stetig verringern.

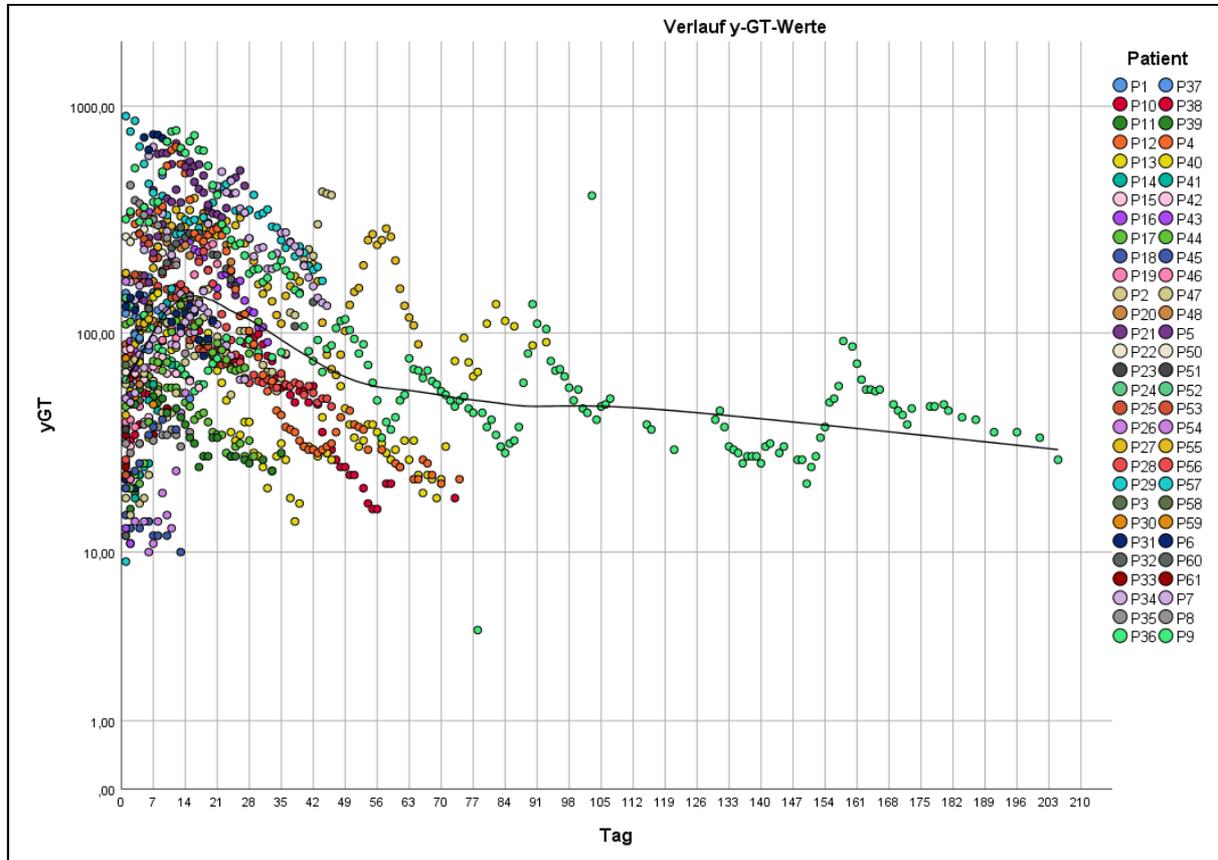
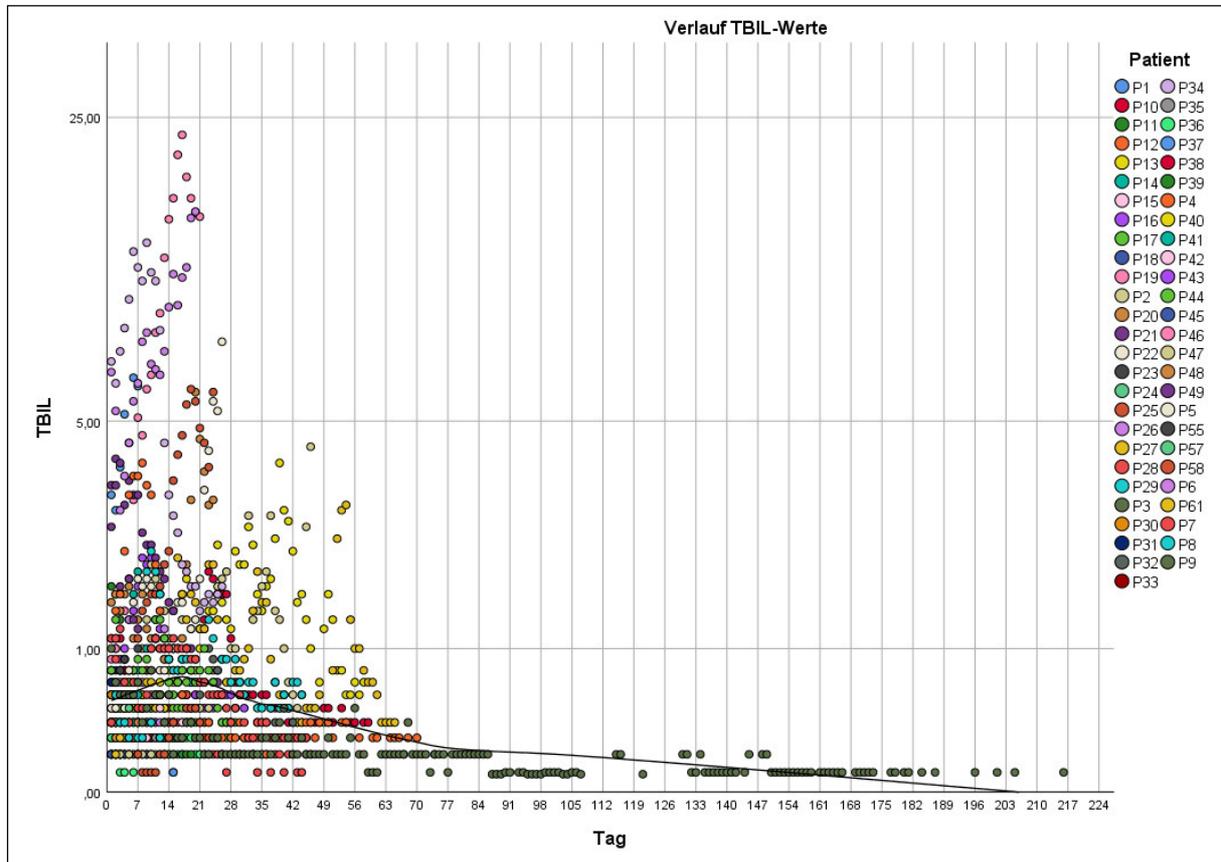


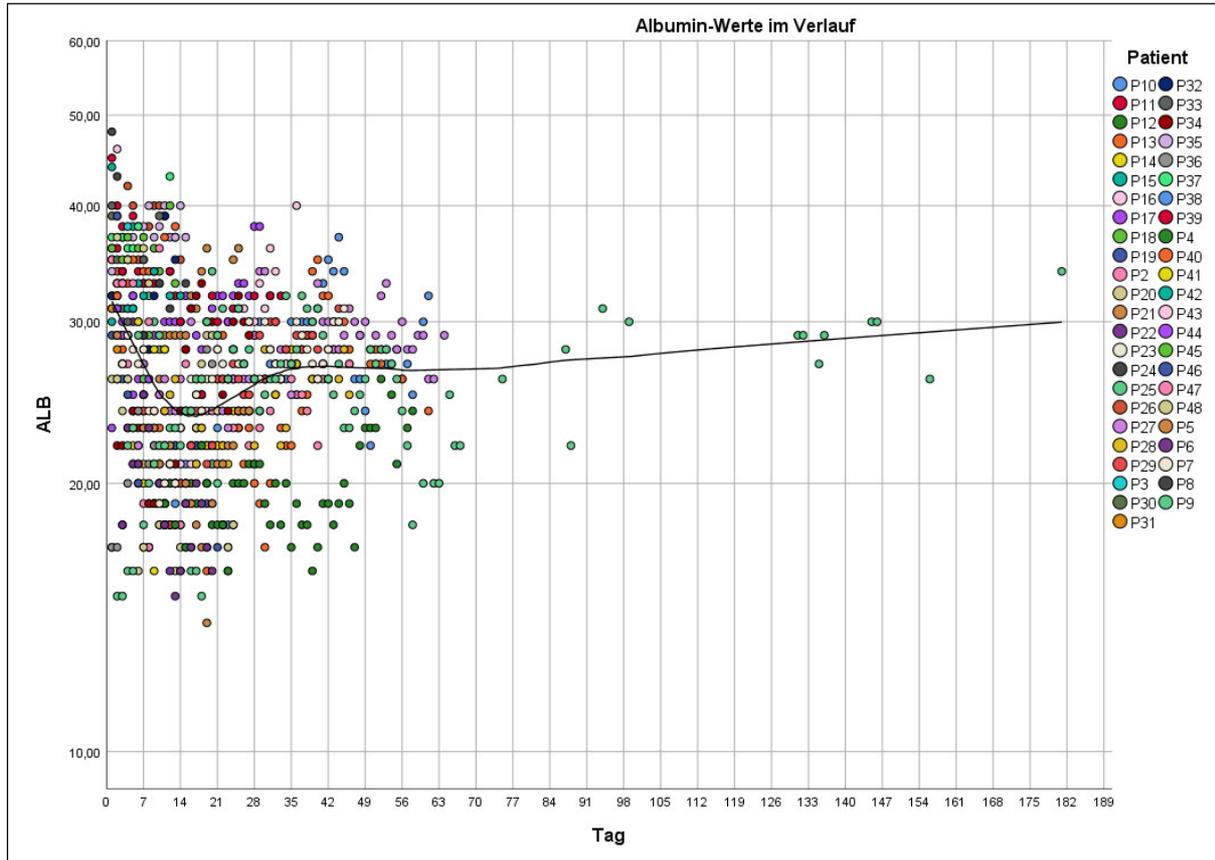
Abbildung 16: Verlauf der  $\gamma$ -GT-Aktivitäten [U/l] von 60 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph

Abbildung 17 stellt den Verlauf der Bilirubin-Konzentrationen gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 1087 Werte ausgewertet (Median 0,5 mg/dl; Streubreite 0,09 – 22,9 mg/dl). Der Graph illustriert einen schwachen Anstieg innerhalb der ersten drei Wochen, steigt dabei jedoch nicht über den ULN von 1,2 mg/dl an. Nach der dritten Woche sinkt die Serumkonzentration konstant.



**Abbildung 17:** Verlauf der Bilirubin-Konzentrationen [mg/dl] von 61 Patienten über 216 Tage mit Loess-Regressionsgraph

Abbildung 18 stellt den Verlauf der Werte des Syntheseparameters Albumin gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 815 Werte ausgewertet (Median 26 g/l; Streubreite 14– 48 g/l). Das Minimum der Kurve wird nach einem steilen Abfall über 14 Tage erreicht. Danach steigt der Graph zuerst steil über drei Wochen, später mit einer geringeren Steigung wieder an. Der physiologische Mindestwert von 35 g/l wird allerdings nicht erreicht.



**Abbildung 18:** Verlauf der Albumin-Werte [g/l] von 61 Patienten über 183 Tage mit Loess-Regressionsgraph

Abbildung 19 stellt den Verlauf der Werte des INR gegen die Zeit dar. Insgesamt wurden 1093 Werte ausgewertet (Median 1,1; Streubreite 0,8-5,2). Der Graph illustriert einen konstanten Verlauf um 1,0 während der ersten Hospitalisationswoche und danach eine schwache Steigung über einen Zeitraum von sieben Wochen. Zwischen dem Niveau von 1,0 und 1,1 verbleibt er bis zu Tag 205.

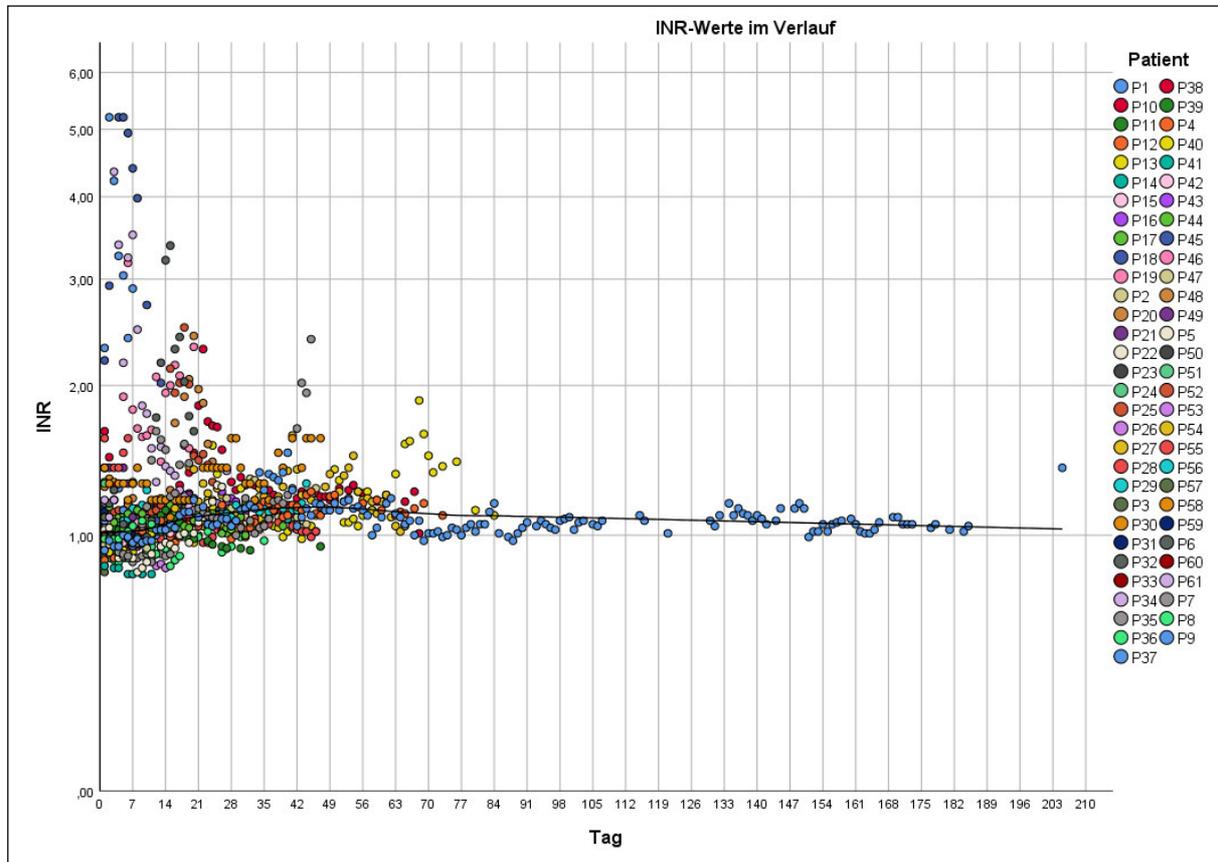


Abbildung 19: Verlauf der INR-Werte von 61 Patienten über 205 Tage mit Loess-Regressiongraph

## 4.2.2 Analyse differenzialdiagnostischer Quotienten

- De-Ritis-Quotient

Der De-Ritis-Quotient wird berechnet, indem die Serumkonzentrationen von AST durch die Serumkonzentrationen von ALT dividiert werden. Dieses Verhältnis der Transaminasen deutet auf die zugrunde liegende Erkrankung der Leber hin, da die beiden Enzyme unterschiedlich lokalisiert sind: AST findet sich zu etwa 80% in den Mitochondrien und zu etwa 20% im Zytoplasma der Hepatozyten und ist nicht leberspezifisch. ALT wiederum ist beinahe ausschließlich in der Leber vorhanden und befindet sich nur zu etwa 20% in den Mitochondrien. Ein De-Ritis-Quotient  $< 1$  deutet auf einen geringen Leberschaden hin, während ein Wert  $> 1$  auf mehr mitochondriale Enzyme im Blut hinweist und eine schwerwiegende Leberzellschädigung aufdeckt. Es wurden insgesamt 134 De-Ritis-Quotienten erstellt, soweit AST und ALT-Werte zu denselben Zeitpunkten von Patienten vorhanden waren. Dies ist in Abbildung 20 logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen worden. Der Median beträgt 1,3 mit einer Standardabweichung von 0,5-27. 75% der Patienten haben einen Wert über dem Cut-off von 1.

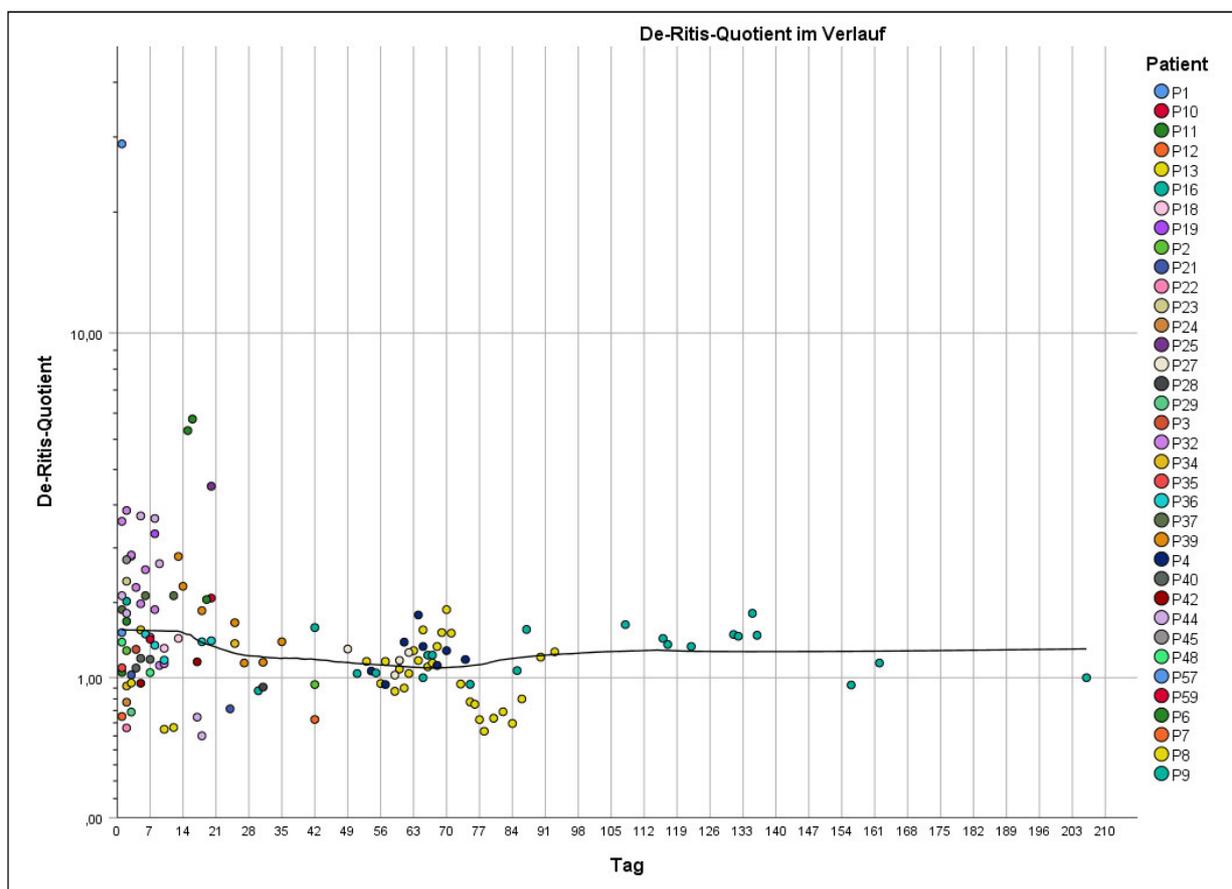


Abbildung 20: De-Ritis-Quotient im Verlauf mit Loess-Regressiongraph

- FIB-4-Score

Der FIB-4-Score (*Fibrosis-4-Score*) ist, ebenso wie der APRI ein nichtinvasiver Index, der es ermöglicht, eine signifikante Leberfibrose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen vorherzusagen. Zusätzlich berücksichtigt werden neben der AST-Aktivität und der Thrombozytenzahl das Alter und der ALT-Wert eines Patienten.

Formel:

$$\frac{\text{Alter}[y] \times \text{AST} [U/l]}{\text{Thrombozytenzahl} [10^9 /l] \times \sqrt{\text{ALT}[U/l]}}$$

Der untere Cut-off liegt hier bei <1,45, mit dem folglich eine Fibrose ausgeschlossen werden kann. Mit Werten >3,25 deutet er mit hoher Spezifität (97%) auf eine Leberfibrose hin.

Wenn von Patienten zum selben Zeitpunkt AST-, ALT-Werte und die Thrombozytenzahl bekannt waren, wurde der FIB-4-Score errechnet und in dem folgendem Graphen gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 21). Der Median aus insgesamt 150 Werten beträgt 1,7 mit einer Streubreite von 0,3-677. Dem Loess-Regressionsgraph zufolge ist der Wert in der ersten Woche nach Hospitalisierung bei 2,0, sinkt auf etwa 1,5 im Laufe von sechs Wochen ab und steigt wieder auf 2,0 bei den Patienten, die über 70 Tage stationiert waren. Ab der 13. Woche ist nur noch ein Patient im Graph eingetragen, bei welchem der FIB-4-Wert stetig auf knapp 1,0 absinkt.

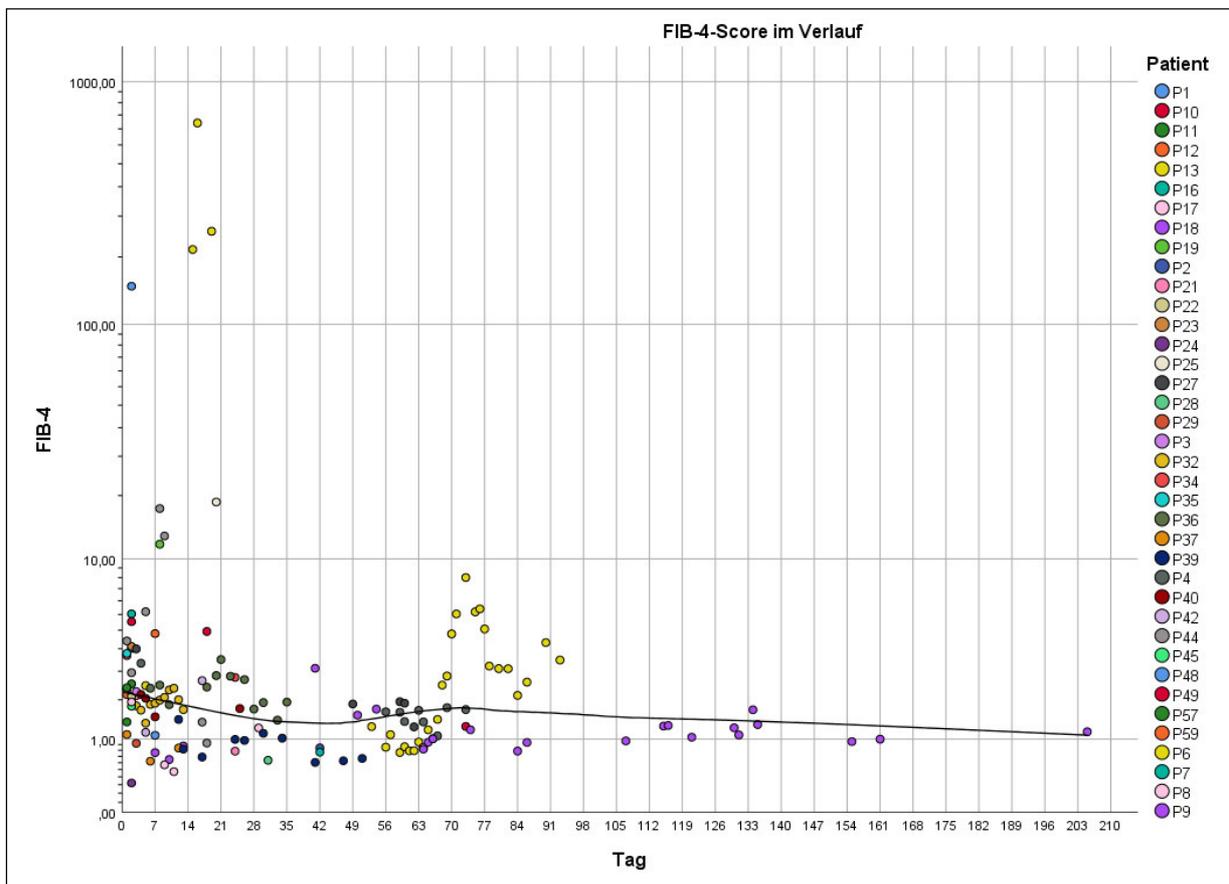


Abbildung 21: FIB-4-Score im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

Inwiefern dieser Index mit einem negativen Outcome zusammenhängt, wurde nach Testen auf Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnoff-Tests ( $p < 0,01$ ) anhand des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikante Ergebnisse wurden in Boxplots logarithmisch skaliert veranschaulicht.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem FIB-4-Score und der Notwendigkeit einer Stationierung auf der Intensivstation besteht auf einem Signifikanzniveau von 0,05 ( $p = 0,01$ ), was in dem Boxplot in Abbildung 22 dargestellt ist. Der Median der Patienten auf der Normalstation beträgt 2,05 (Min=0,32; Max=3,8) im Vergleich zum erhöhten Median der Intensivpatienten mit 3,4 (Min=0,63; Max=676,17). Folglich deutet er auf eine Leberfibrose bei dieser Patientengruppe hin.

Ein erhöhter FIB-4-Score korreliert außerdem signifikant mit dem Versterben ( $p < 0,01$ ), was in Abbildung 23 illustriert wird. Der Median der nicht verstorbenen Patienten liegt mit 2,05 (Min=0,32; Max=5,54) deutlich unter dem Median der verstorbenen Patienten, welcher 9,92 (Min=3,71; Max=676,81) beträgt. Somit liegt die gesamte Streubreite der Verstorbenen über dem für eine signifikante Leberfibrose angegebenen Grenzwert von 3,25.

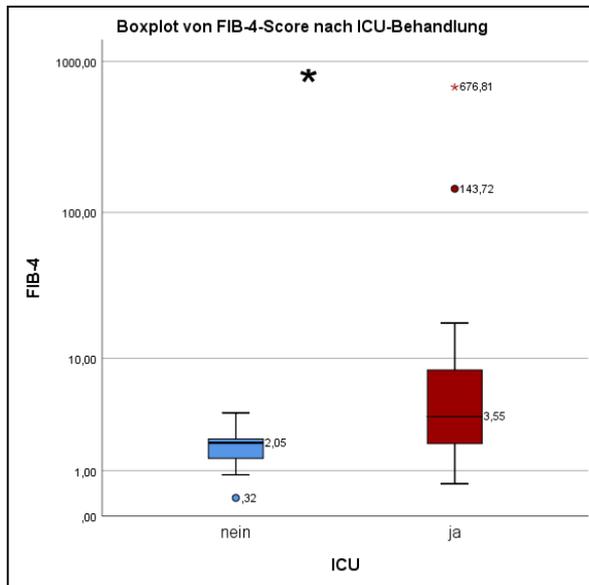


Abbildung 22: Boxplot von FIB-4-Score nach ICU

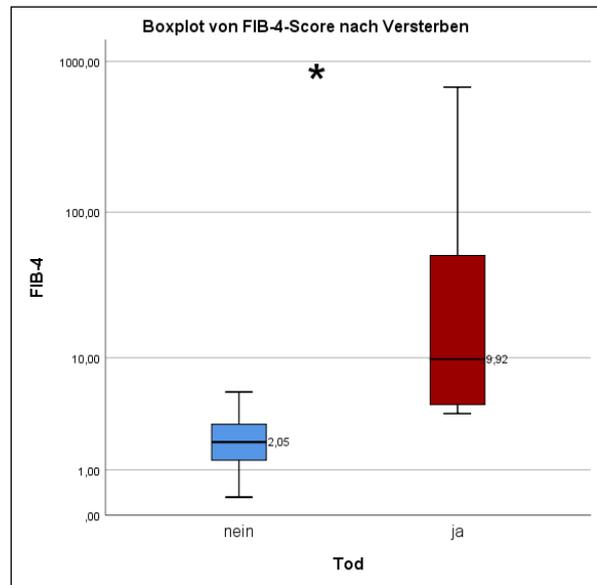


Abbildung 23: Boxplot von FIB-4 nach Versterben

- APRI-Score

Der APRI-Score (engl. *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*) ist ein dimensionsloser Wert, der anhand zwei kombinierter Serumwerte eine Einschätzung über das Ausmaß der Leberfibrose liefert. Er wird mittels des AST-Wertes und der Thrombozytenzahl berechnet und gehört somit zu den nichtinvasiven Indikatoren einer Leberschädigung.

Formel:

$$\frac{\text{AST/ULN von AST} \left[ \frac{\text{U}}{\text{l}} \right]}{\text{Thrombozytenzahl} \left[ \frac{10^9}{\text{l}} \right]} \times 100$$

Der festgelegte Grenzwert für eine signifikante Fibrose ist >1,5. Der Ausschluss einer Fibrose erfolgt ab Werten von < 0,5. Eine Leberzirrhose hingegen kann ab Werten von >2,0 angenommen werden, ausgeschlossen wird sie ab einem Score von <1,0.

Soweit von den Patienten AST-Werte und die Thrombozytenzahl zu demselben Zeitpunkt vorhanden waren, wurde der APRI-Score errechnet. In toto konnte auf 1020 Werte zugegriffen werden, die im folgenden Graphen in Abbildung 24 logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen sind. Der Median beträgt 0,4 und die Streubreite 0,001-2004. In den ersten zweieinhalb Wochen liegt der Loess-Regressionsgraph konstant auf 0,7 und sinkt um den 18. Tag herum langsam ab, bis er ab der siebten Woche auf dem Wert von 0,3 bleibt.

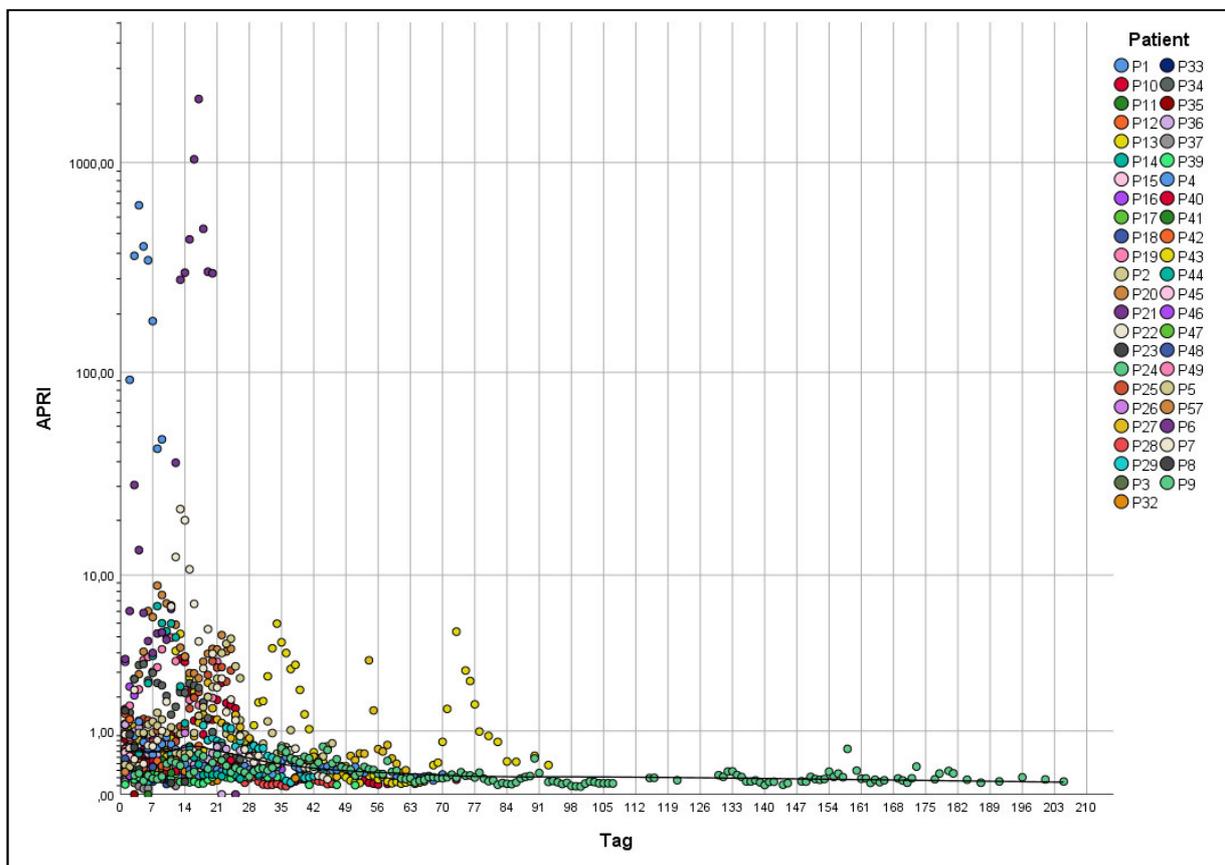
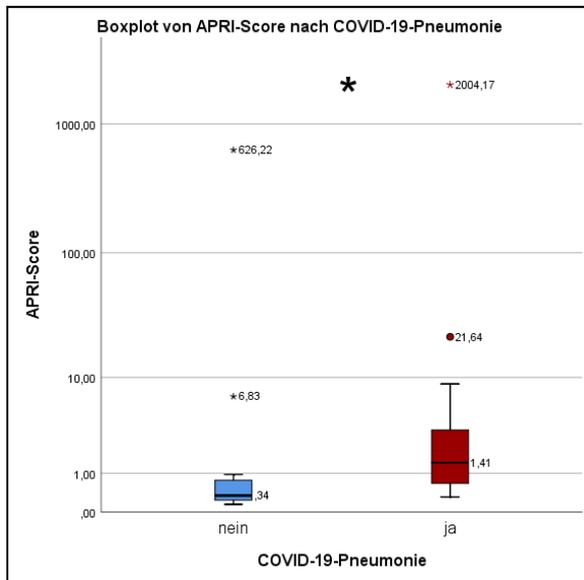
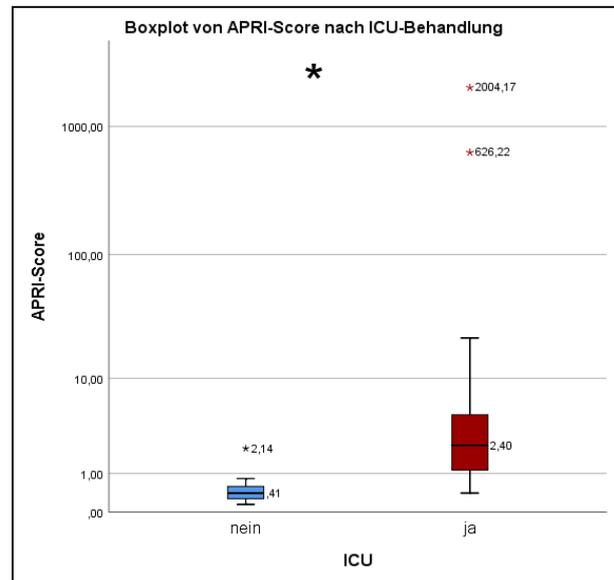


Abbildung 24: APRI-Score im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

Inwiefern dieser erhöhte Leberfibrose-Index mit einem negativen Outcome zusammenhing, wurde nach Testen auf Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnoff-Tests ( $p < 0,01$ ) anhand des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikante Ergebnisse wurden in Boxplots logarithmisch skaliert veranschaulicht. Ein erhöhter APRI-Score korreliert erstens mit der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie ( $p = 0,03$ ) was Abbildung 25 darstellt. Patienten ohne lokale Entzündungsreaktion und somit im Stadium 1 der Erkrankung präsentierten einen medianen APRI-Score von 0,34 (Min=0,15; Max=626,1), während Patienten im Stadium 2 mit Pneumonie einen medianen Score von 1,41 (Min=0,31; Max=2004,17) aufweisen. Zweitens konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem APRI-Score und der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung gefunden werden. Der Median des APRI-Scores von Patienten auf der Normalstation beträgt 0,41 (Min=0,15; Max=2,14), während der Median des APRI-Scores von Intensivpatienten bei 2,4 (Min=0,41; Max=2004) liegt (Abbildung 26).



**Abbildung 25:** Boxplot von APRI-Score nach COVID-19-Pneumonie



**Abbildung 26:** Boxplot von APRI-Score nach ICU-Behandlung

Drittens korreliert ein erhöhter APRI-Score signifikant ( $p = 0,002$ ) mit dem Versterben. Patienten, die entlassen werden konnten, zeigten mediane APRI-Score-Werte von 0,7 (Min=0,15; Max=21,64) im Vergleich zu dem erhöhten Median von 4,5 (Min=0,33; Max=2004) bei im Krankenhaus verstorbenen Patienten. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 27 dargestellt.

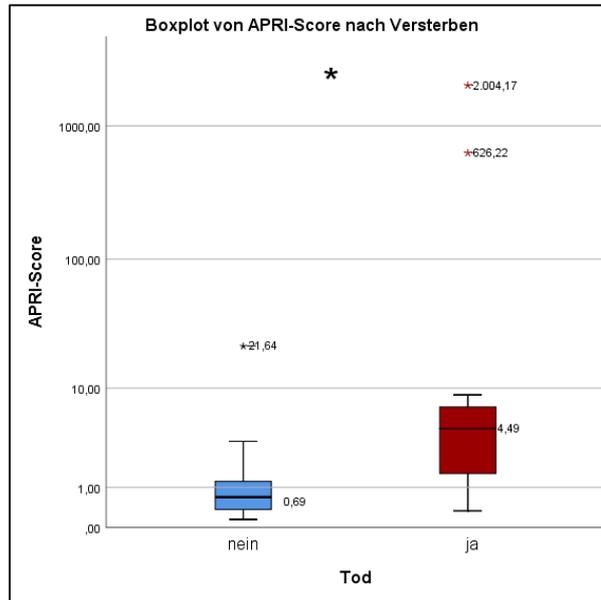


Abbildung 27: Boxplot von APRI-Score nach Versterben

### 4.2.3 Korrelation der Leberparameter mit Charakteristika und Outcome

Ein Mann-Whitney-U-Test oder Zweistichproben-*t*-Test wurden berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Werte der Leberparameter (AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, ALB, INR, APRI) und die Entzündungsmarker (LDH, CRP, IL-6) nach Alter, Geschlecht oder negativem Outcome (COVID-19-Pneumonie, ICU-Behandlung, invasive Beatmung, ECMO-Therapie oder Tod) unterschieden. Vor Durchführung wurde jeweils mithilfe des Kolmogorov-Smirnoff-Tests die Voraussetzung überprüft, ob die Verteilung zwischen beiden Gruppen gleich ist. Bei Normalverteilung in beiden Gruppen wurde der *t*-Test angewandt und die Gruppenunterscheide anhand der Mittelwerte verglichen. Bei unterschiedlicher Verteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test berechnet und die jeweiligen mittleren Ränge verglichen. Die jeweiligen Ergebnisse der sieben dichotomen Kategorien („ja/nein“) werden im Folgenden beschrieben.

- Alter (Cut-off 65 Jahre)

Die Verteilungen der beiden Gruppen nach den Laborparametern AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, ALB, INR, APRI und LDH, CRP, IL-6 unterschieden sich nicht voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ ). Der *t*-Test zeigt für keinen Parameter signifikant unterschiedliche Werte zwischen Patienten älter als 65 Jahre und jünger als 65 Jahre (alle  $p > 0,05$ ).

- Geschlecht

Die Verteilungen von Männern und Frauen nach den Laborparametern INR, TBIL, AST, LDH,  $\gamma$ -GT, CRP, IL-6 und des APRI-Scores unterschieden sich voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Dagegen unterschied sich die Verteilung beider Gruppen nicht für die Werte von Albumin, AP und ALT (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ ). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt signifikant unterschiedliche Werte zwischen männlichen und weiblichen Patienten für alle Parameter. Die deskriptive Statistik der mittleren Ränge zeigt, dass bei Männern höhere Werte von INR, TBIL, AST, LDH,  $\gamma$ -GT, CRP, IL-6 und des APRI-Scores während der COVID-19-Infektion gemessen wurden als bei Frauen. Um den Unterschied auch für ALT, Albumin und AP analysieren zu können, wurden jeweils *t*-Tests durchgeführt. Männliche Patienten hatten signifikant ( $p = 0,04$ ) niedrigere Albumin-Werte und signifikant ( $p = 0,01$ ) höhere AP-Aktivitäten als Frauen. Kein Unterschied kann dagegen bei der ALT nachgewiesen werden.

- COVID-19-Pneumonie

Die Verteilungen der beiden Gruppen nach fast allen Leberparametern und Entzündungsmarkern unterschieden sich voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Hingegen unterschied sich die Verteilung beider Gruppen nicht für die Werte des Entzündungsmarkers IL-6 (Kolmogorov-Smirnov  $p = 0,6$ ). Es gab einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen der Höhe der ausgewerteten Laborparameter zwischen Patienten, die im Verlauf eine COVID-19-Pneumonie entwickelten und denjenigen, die keine entwickelten. Die Analyse der mittleren Ränge zeigt, dass Patienten dieser Studie mit einer COVID-19-Pneumonie höhere Werte von AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, INR, APRI, LDH und CRP und niedrigere Werte von Albumin aufwiesen. Bezüglich IL-6, dessen Mittelwerte aufgrund der nicht unterschiedlichen

Verteilung beider Gruppen verglichen werden, gab es keinen signifikanten Unterschied der Serumkonzentrationen ( $p = 0,06$ ).

- ICU-Behandlung

Die Verteilungen der beiden Gruppen nach allen Leberparametern und Entzündungsmarkern unterschieden sich voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Die ausgewerteten Laborparameter aller Patienten, die im Verlauf eine intensivmedizinische Behandlung benötigen, unterschieden sich signifikant von denjenigen, die nicht intensivmedizinisch behandelt wurden. Patienten auf der Intensivstation wiesen höhere Werte von AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, INR, APRI, LDH, CRP und IL-6 und niedrigere Werte von Albumin auf, wie dem Vergleich der mittleren Ränge zu entnehmen ist.

- Invasive Beatmung

Unterschieden wurden Patienten, deren Lungenventilation durch maschinelle Beatmung und invasiver Atemwegssicherung unterstützt wurde, von den Patienten, die selbstständig atmen konnten. Diejenigen mit einer Nicht-invasiven Ventilation wurden hier den nicht Beatmeten zugeordnet. Die Verteilungen der beiden Gruppen nach fast allen Leberparametern und Entzündungsmarkern unterschieden sich von einander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Nur die ALT war bei beatmeten und nicht beatmeten Patienten gleichverteilt (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ ). Es kann im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe aller ausgewerteten Laborparameter zwischen Patienten, die im Verlauf von einer invasiven Beatmung abhängig waren und denjenigen, die davon unabhängig waren, festgestellt werden. Nach dem Vergleich der mittleren Ränge wird deutlich, dass invasiv beatmete Patienten höhere Werte von AST, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, INR, APRI, LDH, CRP und IL-6 und niedrigere Werte von Albumin präsentierten. Für ALT wurde ein t-Test durchgeführt, welcher keinen signifikanten Unterschied zeigte ( $p = 0,32$ ).

- ECMO-Therapie

Die Verteilungen der beiden Gruppen nach zehn von elf Leberparametern und Entzündungsmarkern unterschieden sich voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Allein nach Unterteilung des Werts von ALT zeigt sich eine gleiche Verteilungsform zwischen beatmeten und nicht beatmeten Patienten (Kolmogorov-Smirnov  $p = 0,06$ ). Nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests kann ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen der Höhe aller ausgewerteten Laborparameter zwischen Patienten, die im Verlauf eine zusätzliche ECMO-Therapie erforderten, und denjenigen, die keine benötigten, festgestellt werden. Nach dem Vergleich der mittleren Ränge wird ersichtlich, dass bei Patienten mit ECMO-Therapie höhere Werte von AST, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, INR, APRI, LDH, CRP und IL-6 und niedrigere Werte von Albumin messbar waren. Hingegen zeigt auch hier der  $t$ -Test zur Beurteilung der ALT-Mittelwerte keinen signifikanten Unterschied an ( $p = 0,53$ ).

- Tod

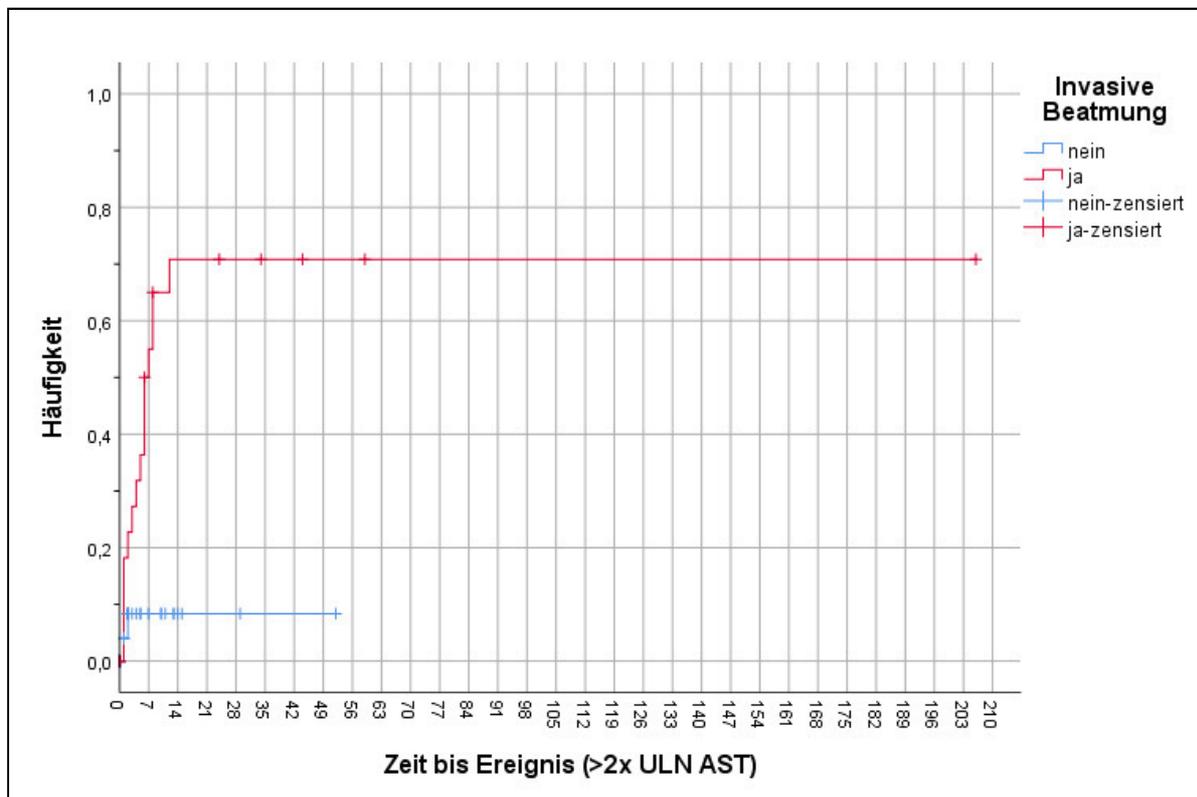
Die Verteilungen von Verstorbenen und Überlebenden nach zehn von elf Laborparametern unterscheiden sich voneinander (Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ). Dagegen unterschied sich die Verteilung beider Gruppen nicht hinsichtlich der ALT (Kolmogorov-Smirnov  $p = 0,7$ ). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt auf dem 0,05-Niveau signifikant unterschiedliche Werte zwischen den beiden Gruppen für alle Parameter außer für AP und  $\gamma$ -GT. Die deskriptive Statistik beschreibt, dass bei den verstorbenen Patienten die Werte von INR, TBIL, AST, LDH,  $\gamma$ -GT, CRP, IL-6 und APRI stärker anstiegen als bei den Patienten, die genesen sind. Die Korrelation zu Albumin ist auch hier wie zu erwarten invers: Verstorbene Patienten präsentierten niedrigere Albuminspiegel als Entlassene. ALT-Konzentrationen unterschieden sich im  $t$ -Test nicht voneinander ( $p = 0,3$ ).

- Häufigkeit des Überschreitens des Normwerts

Mit dem Ziel, das Ausmaß der Leberwerterhöhung innerhalb bestimmter klinischer Kategorien präziser auswerten zu können, wurde die Kaplan-Meier-Analyse mit dem Log-Rank-Test gewählt, ursprünglich eine statistische Art der Überlebenszeitanalyse. Die drei Kategorien „COVID-19-Pneumonie“, „invasive Beatmung“ (entspricht Stadium 2 s. Kapitel 2.1) und „Tod“ (entspricht Stadium 3 s. Kapitel 2.1) deuten auf den Schweregrad der COVID-19-Erkrankung bei den jeweiligen Patienten hin. Auf der Basis soll verglichen werden, ob die Gruppen sich dahingehend unterscheiden, mit welcher Häufigkeit der ULN bestimmter Leberparameter im Laufe ihres gesamten Krankenhausaufenthaltes überschritten wird. Zur Erstellung einer Kaplan-Meier-Kurve muss ein Ereignis definiert werden. Folgerichtig ist das Ereignis „Überschreiten des ULN“, wobei zum Zeitpunkt des Ereignisses (Tag des Krankenhausaufenthaltes) die Kurve einen Schritt nach oben macht. Patienten, die nie den oberen Grenzwert überschritten haben, zuvor entlassen wurden oder auch verstarben, sind durch senkrechte Striche als „zensiert“ gekennzeichnet. Der Log-Rank-Test vergleicht abschließend die beiden Kurven auf dem Signifikanzniveau von 0,05.

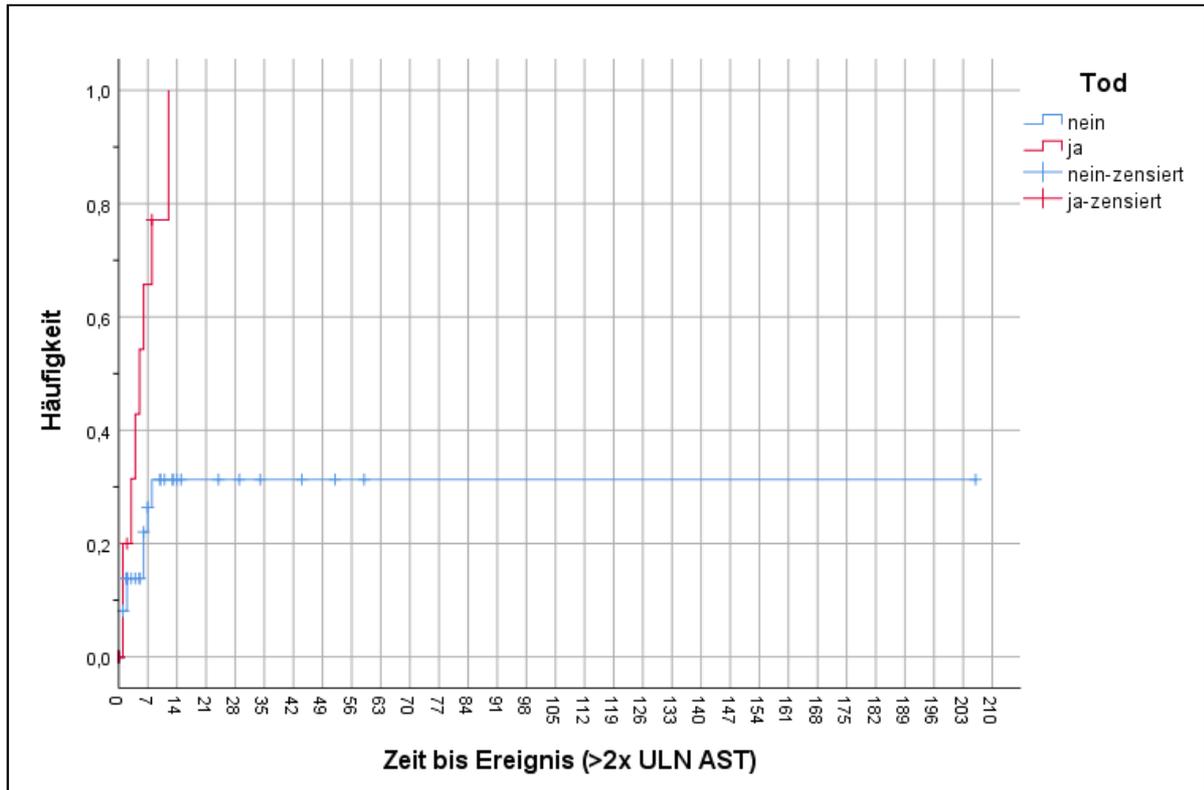
- AST

Aufgrund der großen Streubreite der Werte dieser Transaminase und der stärkeren Aussagekraft wurde das Zweifache des ULN als Cut-off gewählt und nach geschlechtsspezifischen Normwerten unterschieden ( $\text{♂} >100 \text{ U/l}$ ;  $\text{♀} >70 \text{ U/l}$ ). Mit einem p-Wert im Log-Rank-Test gleich 0,06 unterscheiden sich die Gruppen der Patienten mit und ohne COVID-19-Pneumonie nicht. Signifikant ist dagegen der Unterschied zwischen beatmeten und nicht beatmeten Patienten ( $p = 0,001$ ) sowie zwischen verstorbenen und nicht verstorbenen Patienten ( $p = 0,002$ ). Abbildung 28 illustriert die Kaplan-Meier-Kurve für AST-Aktivitäten nach Einteilung in Patienten mit und ohne invasive Beatmung. 15 von 25 (60%) beatmete Patienten wiesen AST-Werte über dem zweifachen ULN auf, jedoch nur zwei von 36 nicht beatmeten Patienten (5%). Die Kaplan-Meier-Kurve illustriert die kumulative Häufigkeit, dass ein invasiv beatmeter Patient im Laufe seines Krankenhausaufenthaltes einen AST-Wert höher als das zweifache ULN hat.



**Abbildung 28:** Kaplan-Meier-Kurve: Häufigkeit des Überschreitens des zweifachen ULN von AST nach Beatmung

Die Häufigkeit des Überschreitens des zweifachen ULN von AST gruppiert nach Versterben ist in Abbildung 29 zu sehen. 8 von 14 (58%) verstorbenen Patienten wiesen AST-Werte über dem zweifachen ULN auf, jedoch nur neun von 47 nicht verstorbenen Patienten (19%). Die Kaplan-Meier-Kurve illustriert hier, dass die sechs zensierten Patienten unter den Verstorbenen zeitlich vorher aus der Analyse ausgeschlossen worden sind, als diejenigen, die Werte über dem Grenzwert aufwiesen. Alle verstorbenen Patienten präsentierten bereits in den ersten zwei Wochen AST-Konzentrationen über dem definierten Grenzwert oder erlagen den Folgen der Covid-19-Erkrankung bereits vorher.



**Abbildung 29:** Kaplan-Meier-Kurve: Häufigkeit des Überschreitens des zweifachen ULN von AST nach Versterben

- $\gamma$ -GT

Als Cut-off wurden die geschlechtsspezifischen Normwerte 60 U/l ( $\sigma$ ) und 40 U/l ( $\rho$ ) festgelegt. Im Log-Rank-Test resultiert ein signifikanter ( $p = 0,003$ ) Unterschied des Überschreitens des ULN zwischen den Patienten, die eine Pneumonie entwickelten und denen, die keine entwickelten, sowie zwischen den Patienten mit und ohne invasiver Beatmung ( $p = 0,14$ ). Nicht signifikant hingegen ist der Vergleich zwischen verstorbenen und überlebenden Patienten ( $p = 0,3$ ).

33 der 41 (80%) an COVID-19-Pneumonie-Erkrankten wiesen  $\gamma$ -GT-Aktivitäten über dem geschlechtsspezifischen Normwert auf, wohingegen dies nur bei neun der 20 Patienten (45%) ohne Pneumonie gemessen wurde. Auch nach Aufteilung der Patienten in invasiv Beatmete und nicht Beatmete ist mit 92% (22/24) der Anteil der invasiv beatmeten Patienten, die zu einem Zeitpunkt  $\gamma$ -GT-Werte über dem ULN aufwiesen größer, als der der nicht Beatmeten (54%).

Graphisch aufgetragen sind die Kurven nach Pneumonieentwicklung in Abbildung 30 und nach Notwendigkeit invasiver Beatmung in Abbildung 31.

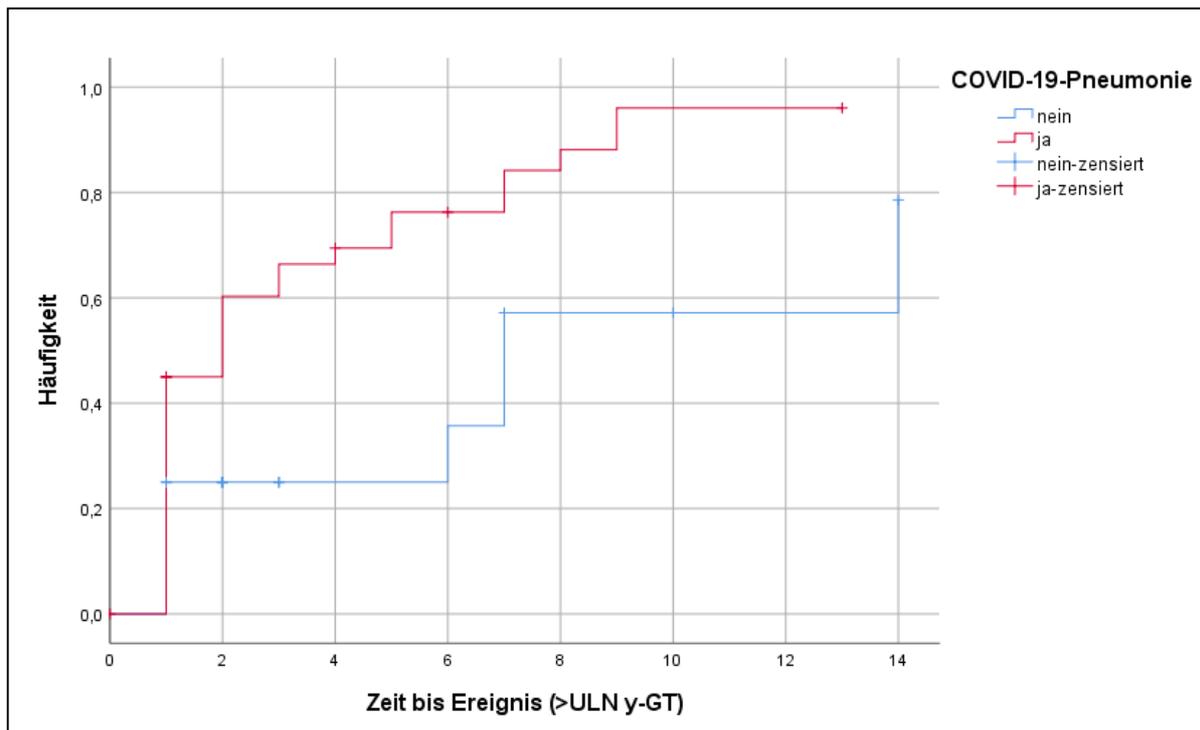


Abbildung 30: Häufigkeit des Überschreitens des ULN von  $\gamma$ -GT nach COVID-19-Pneumonie

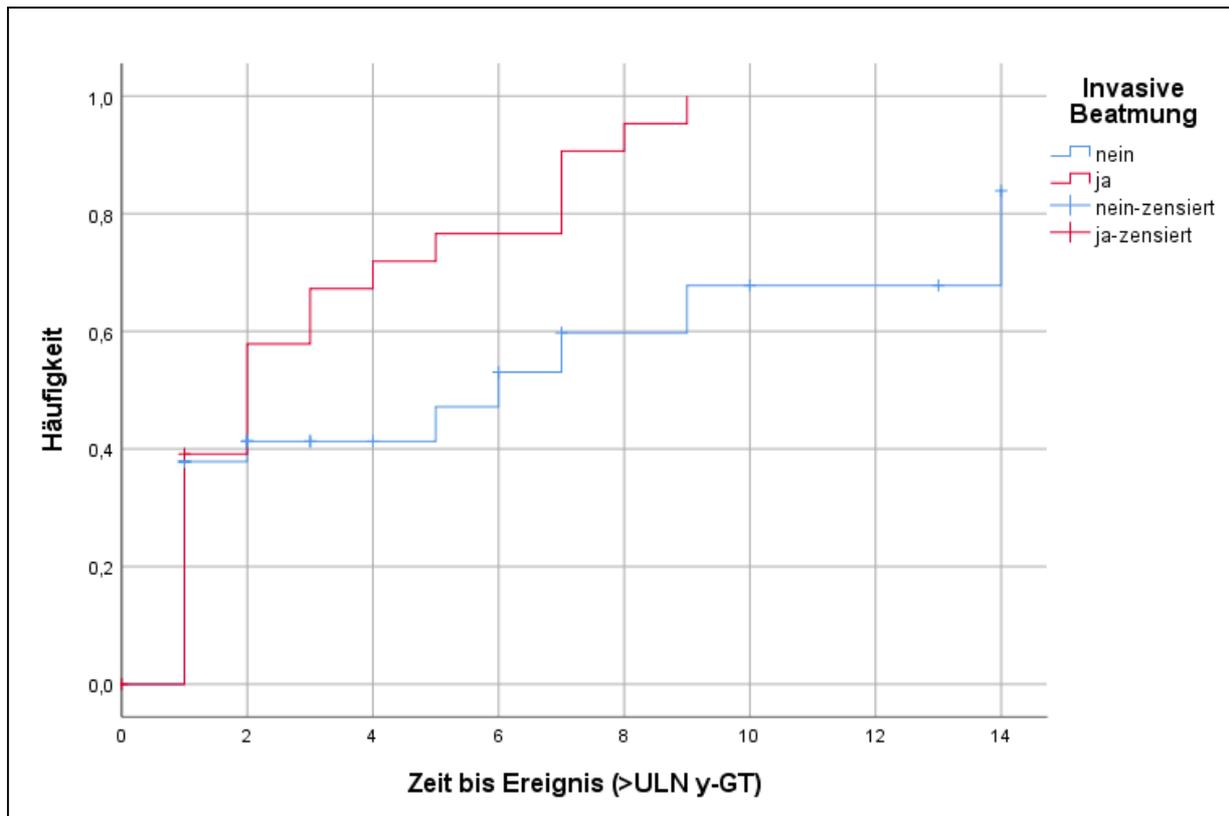


Abbildung 31: Häufigkeit des Überschreitens des ULN von y-GT nach Beatmungstyp

- Albumin

Der Cut-off-Wert für Albumin beträgt 35 g/l für beide Geschlechter. Der Log-Rank-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied der Kaplan-Meier-Kurven für die Gruppen mit und ohne COVID-19-Pneumonie, mit und ohne invasive Beatmung und für Verstorbene und Überlebende (jeweils  $p > 0,05$ ).

#### 4.2.4 Korrelation Leberparameter und Entzündungsmarker: Ist Zellschädigung auf Leber begrenzt oder systemisch?

Ergänzend zu den Leberparametern wurden die Entzündungsmarker CRP und IL-6 sowie der Hämolyseparameter LDH im Patientenblut bestimmt und analysiert.

- Laktatdehydrogenase

Abbildung 32 illustriert den Verlauf von 1133 LDH-Werten (Median 406 U/l; Streubreite 47-13797 U/l).

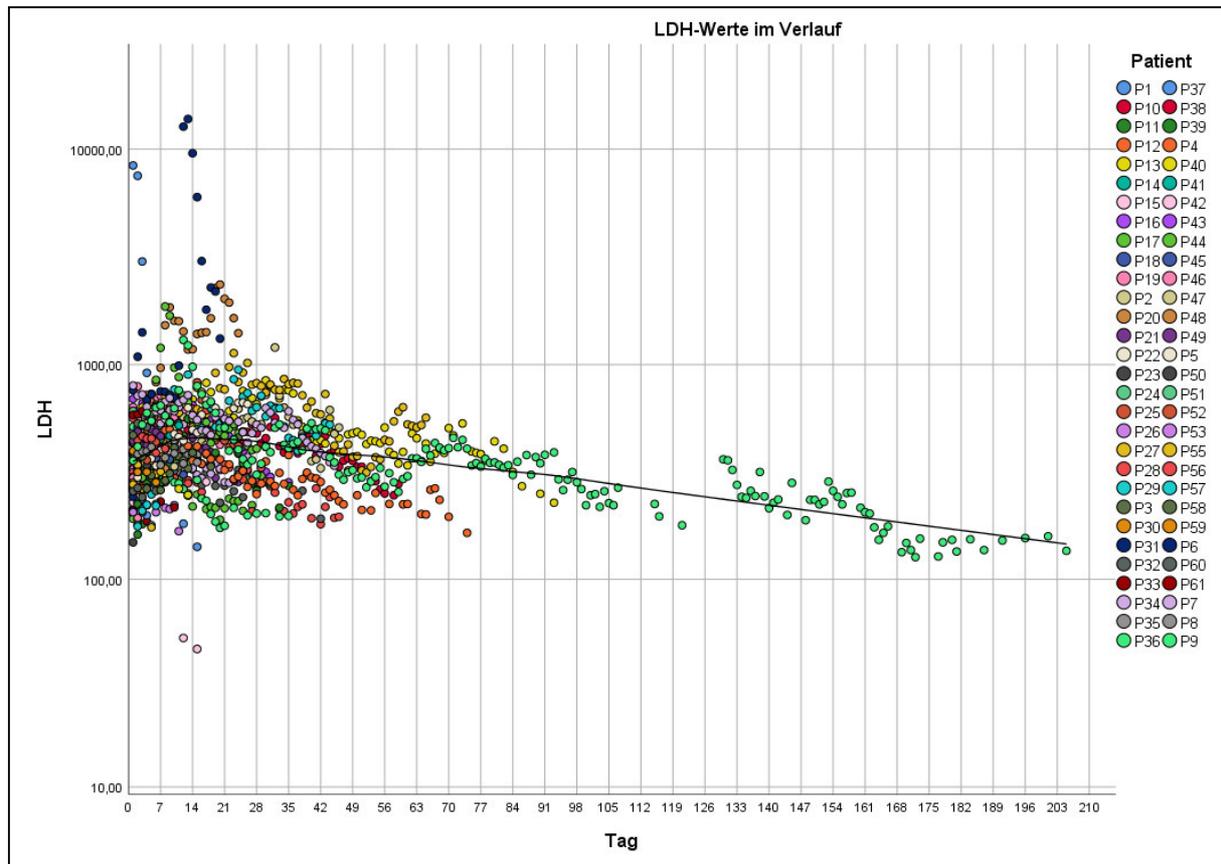


Abbildung 32: LDH-Werte im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

Um zu überprüfen, ob die Transaminasenerhöhung allein aufgrund von Leberzelluntergang oder zusätzlich aufgrund von systemischen, nicht auf die Leber begrenztem Zelluntergang auftrat, wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für die Werte von AST und LDH berechnet. Es zeigt eine signifikant positive Korrelation zwischen AST- und LDH-Werten punktuell am Aufnahmetag (Korrelationskoeffizient 0,7;  $p < 0,01$ ) sowie zwischen AST- und LDH-Werten im Gesamtverlauf (Korrelationskoeffizient 0,7;  $p < 0,01$ ).

Im Interesse stand außerdem ein möglicher Zusammenhang zwischen LDH und dem Cholestasemarker  $\gamma$ -GT. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient beträgt 0,5 und ist auf dem 0,01 Niveau zweiseitig signifikant ( $p < 0,01$ ) für LDH- und  $\gamma$ -GT-Werte im Gesamtverlauf. Eine positive Korrelation (0,3) resultiert ebenfalls für die Aufnahmewerte, soweit sie zur Verfügung standen ( $p = 0,01$ ).

Als Syntheseparameter wurde Albumin gewählt, mithilfe dessen getestet werden sollte, ob die abnehmende Syntheseleistung der Leber mit dem Zelluntergangsmarker LDH zusammenhängt. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ist hierbei mit -0,4 negativ und ist sowohl für alle kumulativen Werte als auch für die Werte am Aufnahmetag auf dem Niveau  $p = 0,05$  zweiseitig signifikant.

Des Weiteren wurde der für die Differenzialdiagnostik eingesetzte LDH/AST-Quotient benutzt. Der Cut-off-Wert liegt hierbei bei 12: Werte  $> 12$  deuten auf eine Hämolyse hin und Werte  $< 12$  auf Leber- oder Gallenwegserkrankungen. In toto wurden 934 LDH/AST-Quotienten ausgewertet, die in Abbildung 33 gegen die Zeit aufgetragen wurden (Median 11; Streubreite 0,23-49).

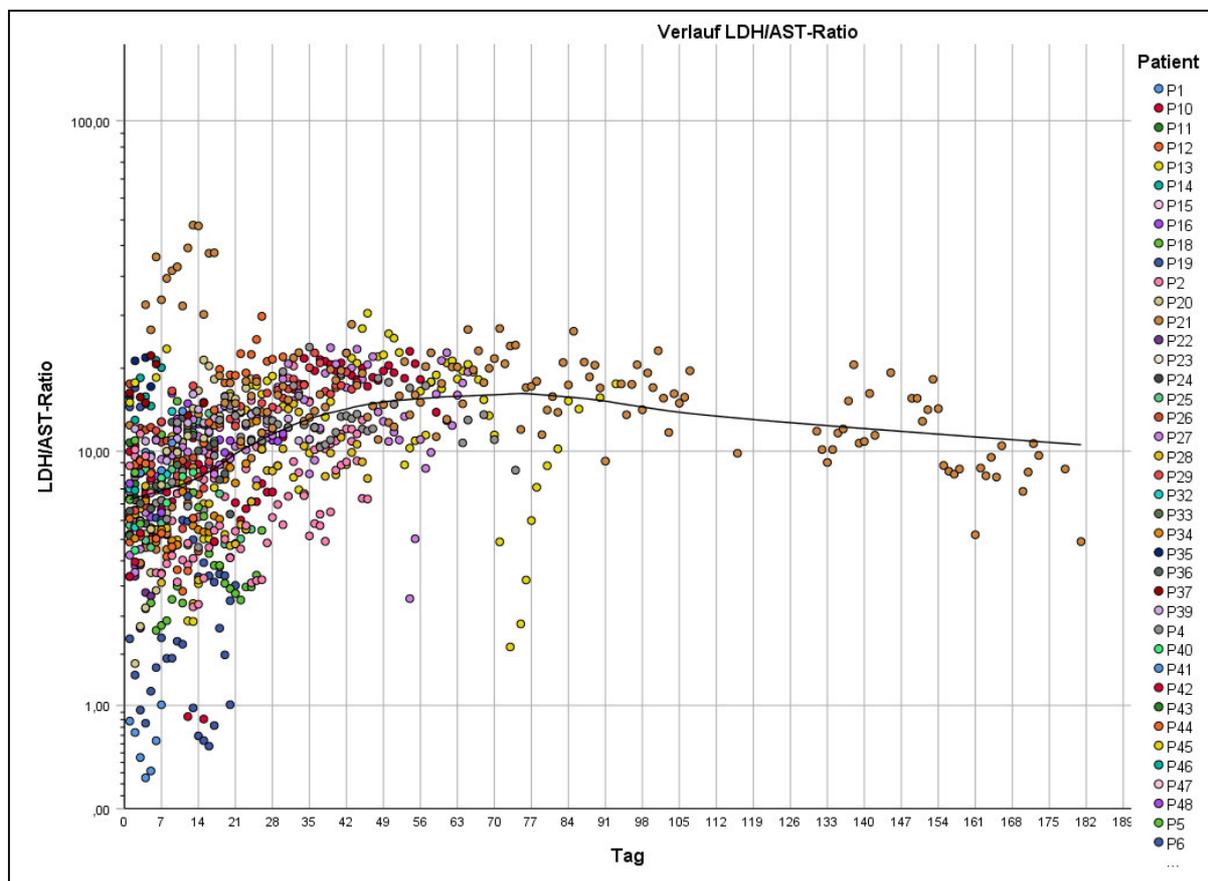
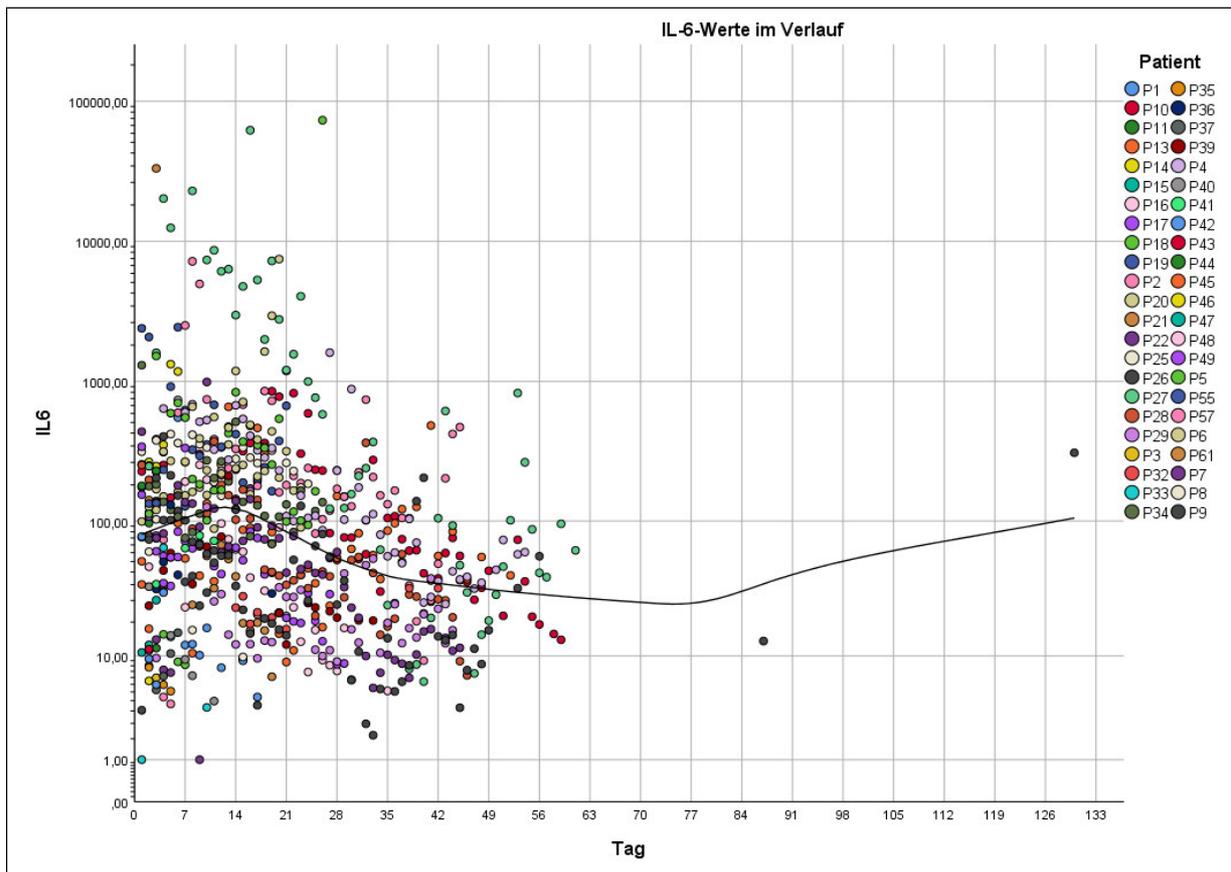


Abbildung 33: LDH/AST-Ratio im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

- Interleukin-6

In Abbildung 34 sind 739 IL-6 Werte gegen die Zeit aufgetragen. Der Median liegt mit 76 pg/ml über dem Grenzwert des UKS-Labors von 7 pg/ml. Die Streubreite liegt zwischen 1 und 73262 pg/ml. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für IL-6- und AST-Werte über den gesamten stationären Aufenthalt gemessen, beträgt 0,5 und ist auf dem 0,01 Niveau zweiseitig signifikant ( $p < 0,01$ ). Die jeweiligen Werte punktuell am Aufnahmetag zeigen keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,16$ ).



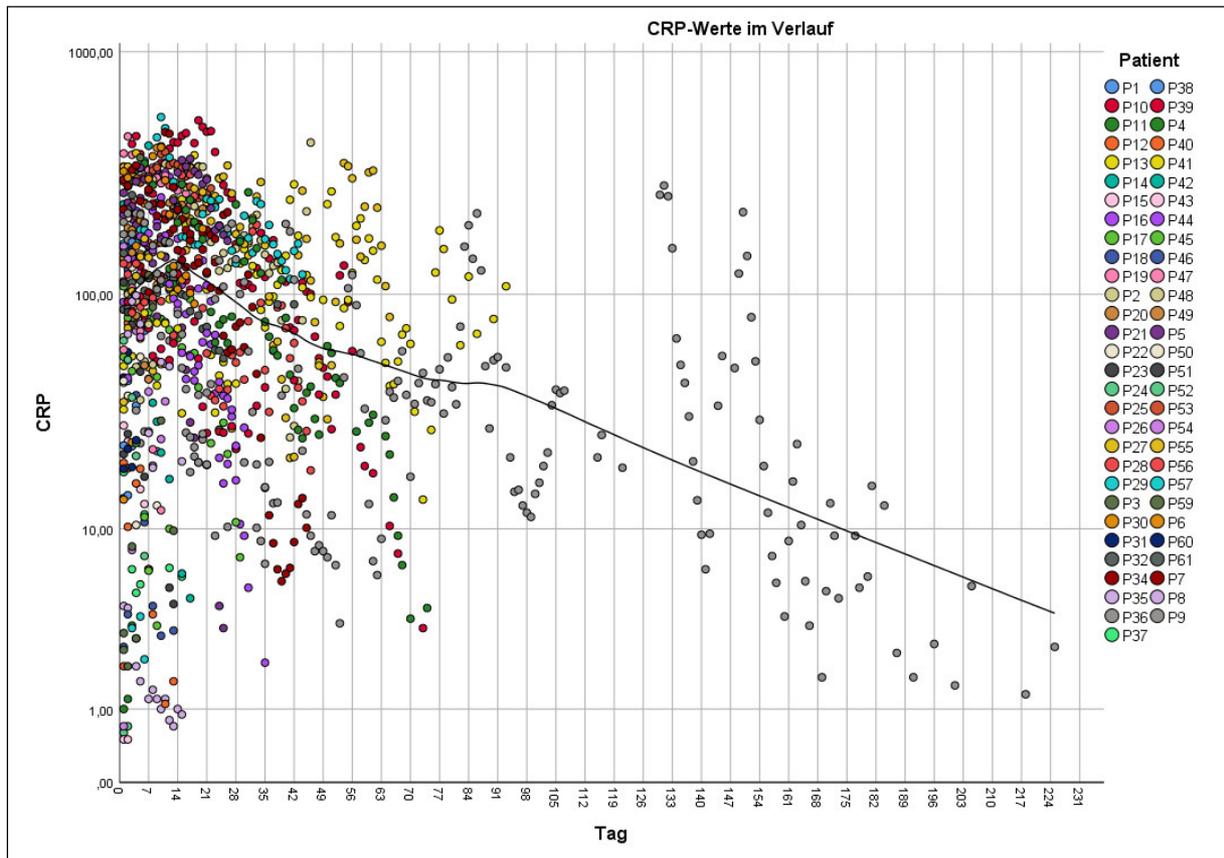
**Abbildung 34:** IL-6-Werte im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für IL-6- und  $\gamma$ -GT-Werte über den gesamten stationären Aufenthalt gemessen, ist mit 0,1 leicht positiv und ist zweiseitig signifikant ( $p < 0,01$ ). Die jeweiligen Werte punktuell am Aufnahmetag zeigen keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,07$ ).

Erwartungsgemäß ist der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für IL-6- und ALB-Werte über den gesamten stationären Aufenthalt gemessen mit -0,5 negativ und ist auf dem 0,01 Niveau zweiseitig signifikant ( $p < 0,01$ ). Die jeweiligen Werte punktuell am Aufnahmetag zeigen ebenfalls einen signifikanten inversen Zusammenhang (Koeffizient -0,7;  $p = 0,03$ ).

- CRP

1146 CRP-Werte von 61 Patienten wurden über deren jeweilige Aufenthaltsdauer abgenommen und sind in der folgenden Abbildung 35 logarithmisch skaliert aufgetragen (Median 97 mg/l; Streubreite 0,5-539mg/l).



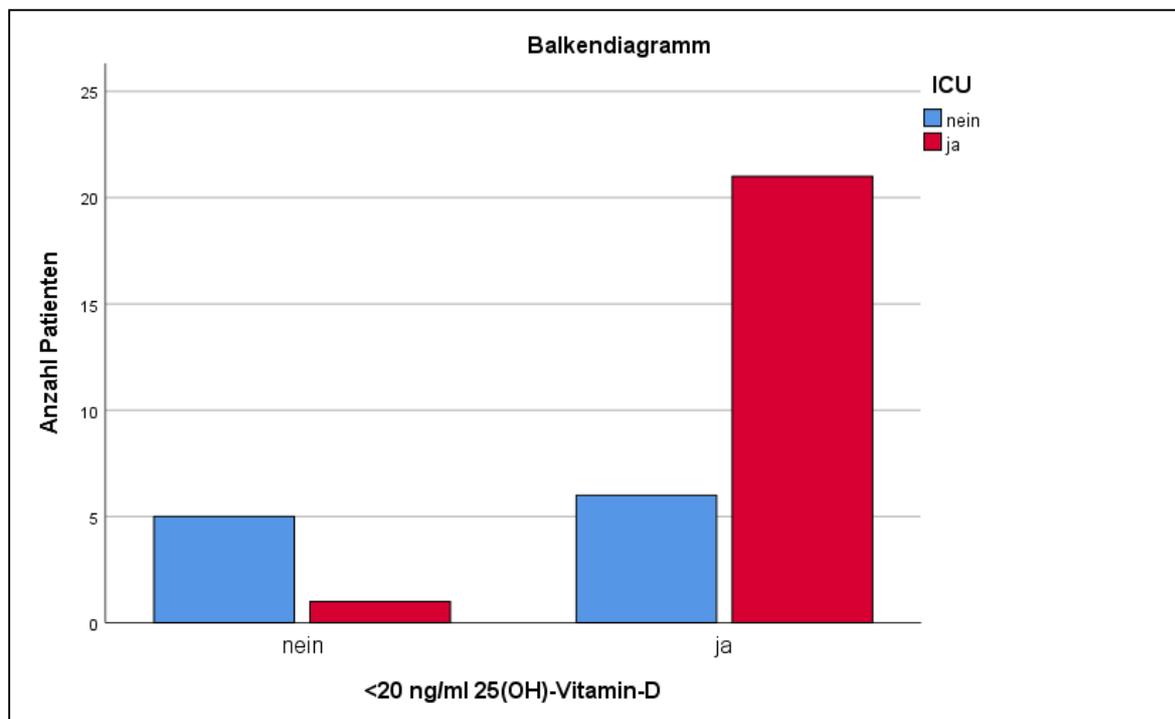
**Abbildung 35:** CRP-Werte im Verlauf mit Loess-Regressionsgraph

Ob ein Zusammenhang zwischen dem Entzündungswert CRP und der AST-Aktivität besteht, wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationstest überprüft. Das Ergebnis zeigt eine positive signifikante Korrelation ( $p < 0,01$ ) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,5 für alle Werte. Ein positiver Zusammenhang konnte außerdem bei den jeweiligen Aufnahmewerten beobachtet werden (Korrelationskoeffizient nach Spearman 0,4;  $p = 0,01$ ). Die Analyse der Spearman-Rangkorrelation zwischen CRP und der  $\gamma$ -GT zeigt ebenfalls eine positive Korrelation (Koeffizient 0,4;  $p < 0,01$ ), sowohl bei den gesamten Werten und den Werten am Aufnahmetag (Koeffizient 0,4;  $p = 0,004$ ). Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Syntheseparameter Albumin und dem Entzündungswert zeigt einen negativen Korrelationskoeffizienten für alle kumulativen Werte (-0,5) und die Aufnahmewerte (-0,6). Beide Korrelationen sind auf dem Niveau  $p < 0,01$  zweiseitig signifikant.

### 4.3 Vitamin D-Status

Der Vitamin D-Status, gemessen an der 25(OH)-Vitamin D-Konzentration im Serum, konnte bei 33 Patienten erfasst werden. Ein Vitamin D-Mangel ist definiert mit einem Wert  $<20$  ng/ml 25(OH)-Vitamin D. Auffällig ist, dass von 33 Patienten 27 (82%) bei Aufnahme unter einem so definierten Vitamin D-Mangel litten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der untersuchten Korrelationen zwischen Vitamin D-Mangel und Alter, Schweregrad der Erkrankung sowie zwischen Vitamin D und den Leberparametern und Entzündungsmarkern vorgestellt.

Eine intensivmedizinische Behandlung kann mit einem Vitamin D-Mangel signifikant assoziiert werden ( $p = 0,01$ ), wie in Abbildung 37 graphisch verdeutlicht wird. 21 von 22 Patienten (96%) auf der Intensivstation litten unter einem Vitamin-D-Mangel im Vergleich zu sechs von 11 Patienten (55%) auf der normalen Infektionsstation.



**Abbildung 36:** Vergleich der Patienten mit Vitamin-D-Mangel in ICU-Behandlung

Keine Korrelation zeigt sich währenddessen zwischen einem Vitamin D-Mangel und der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, der Notwendigkeit einer invasiven Beatmung, einer ECMO-Therapie oder dem Versterben. Ebenso wenig korreliert in dieser Kohorte ein Vitamin-D-Mangel mit einem Alter über 65 Jahren (jeweils  $p > 0,05$ ).

Um zu ermitteln, ob ein Vitamin D-Mangel zunächst mit dem generellen Auftreten pathologischer Leberwerten zusammenhängt, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt, der keinen signifikanten Zusammenhang aufzeigt ( $p > 0,09$ ). Die einzelnen Leberparameter und Entzündungsmarker sollten zusätzlich

einzelnen auf einen möglichen Zusammenhang mit einem Vitamin D-Mangel überprüft werden. Im Kolmogorov-Smirnoff-Test wurden die Laborparameter auf Normalverteilung überprüft. Da alle normalverteilt sind ( $p > 0,05$ ), wurde im Folgenden der  $t$ -Test verwendet. Es konnten signifikante Zusammenhänge zwischen erhöhten  $\gamma$ -GT-Werten und Vitamin D-Mangel ( $p = 0,002$ ) sowie erhöhten CRP-Werten ( $p = 0,037$ ) und Vitamin D-Mangel beobachtet werden. Patienten mit einem Vitamin D-Mangel während ihres Krankenhausaufenthaltes wiesen höhere  $\gamma$ -GT-Werte auf (MW=343 U/l; SD=258), als Patienten mit einem normalen 25(OH)Vitamin D-Status (MW=120 U/l; SD=97). Mit einem Mittelwert von 288 mg/l (SD=145) hatten Patienten mit einem Vitamin D-Mangel außerdem deutlich höhere Werte des Entzündungsmarkers CRP als Patienten, die nicht an einem Vitamin D-Mangel litten (MW=148 mg/l; SD=123).

## 4.4 Genotypisierung

### 4.4.1 Ergebnisse der allelischen Diskriminierung

Die molekulargenetischen Analysen fokussieren auf die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen in Genen der Patienten-DNA, die mögliche Risikofaktoren für eine Leberbeteiligung bei COVID-19 darstellen. Die folgenden Tabellen beinhalten die Auswertung der allelischen Diskriminierung mittels *TaqMan® Assays*.

- A1AT-Mangel

Dem Mangel an A1AT liegt eine Genmutation des polymorphen *SERPINA1*-Gens zugrunde, welches auch Protease-Inhibitor-Gen (PI) genannt wird. Das Gen hat zwei Allele, von denen der Wildtyp mit *M* bezeichnet wird und bei 85%-90% der Bevölkerung auftritt. Die am häufigsten vorkommenden mutierten Allele sind *S* (Glu264Val) und *Z* (Glu342Lys) [16]. In der Promotor-Region des *SERPINA1*-Gens kann es ebenfalls zu einem Basenaustausch durch den SNP rs8004738 kommen, aufgrund dessen A1AT in verringertem Maße synthetisiert wird [23]. Der PI-S-Genotyp führt zu einer Instabilität des Genprodukts durch intrazellulären Abbau und zu einer leichten Verminderung des Serum-A1AT. Im Unterschied dazu resultiert die Z-Mutation in einer Retention von A1AT im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten und somit neben stark verminderten Serumwerten auch in einer Zellschädigung der Leber [84].

**Tabelle 14:** Häufigkeit der Genotypen PiS (rs17580), PiZ (rs28929474) und des *SERPINA1*-Polymorphismus (rs8004738)

	Allelfrequenz der Genotypen (%)		
	<i>PiS</i>	<i>PiZ</i>	<i>SERPINA1</i>
<b>Major</b>	44 (0,97)	42 (0,96)	12 (0,54)
<b>Heterozygot</b>	1	2	24
<b>Minor</b>	0 (0,03)	1 (0,04)	8 (0,45)

- Steatose

Die folgenden Gene können Polymorphismen aufweisen, die allesamt genetische Risikofaktoren für MAFLD, Leberfibrose und sich daraus entwickelnde Zirrhose sind. Das *PNPLA3*-Gen exprimiert das Enzym Adiponutrin, welches große Ähnlichkeit hat zur Adipozyten-Triacylglycerin-Lipase (ATGL/PNPLA2), dem ersten Enzym der Lipolyse, welches die Triglyzerid-Hydrolyse katalysiert. Adiponutrin besitzt ebenfalls eine Triglyzerid-Hydrolaseaktivität, womit ihm eine Rolle im Lipidstoffwechsel der Leber zugesprochen wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von PNPLA3 durch erhöhte Aufnahme von Kohlenhydraten und Fettsäuren induziert wird [133]. Das durch die I148M-Variante veränderte Enzym verliert einerseits seine Hydrolase-Funktion und entzieht sich andererseits dem proteolytischen Abbau und sammelt sich vermehrt auf hepatischen Lipidtröpfchen an [12]. Yang et al. [131] konnten eine starke Interaktion zwischen PNPLA3 und dem Protein  *$\alpha/\beta$ -hydrolase-domain-containing 5* (ADHB5) zeigen. Das ADHB5-Protein ist ein wichtiger Co-Aktivator der ATGL, kann jedoch stärker vom veränderten Adiponutrin gebunden werden. Aufgrund dieser Sequestrierung steht es der ATGL nicht mehr zur Verfügung und die in den Hepatozyten vorhandenen Triacylglyceride werden nicht mehr hydrolysiert. Die verminderte Lipolyse resultiert somit in einer Vermehrung und Vergrößerung von hepatischen Lipidtröpfchen, was eine Lipidakkumulation und Inflammation zur Folge hat [131].

*MBOAT7* wiederum kodiert für die LPLAT7, welches Umbauprozesse im Phospholipid-Remodeling-Pathway (*Lands' Cycle*) katalysiert. In diesem Umbauprozess werden die Anordnung und Verteilung von Fettsäuren der Phospholipide nach deren *De-novo*-Synthese noch verändert. Membranphospholipide sind metabolisch aktiv und durchlaufen eine Reihe von Deacylierungs- und Reacylierungsreaktionen, die zum Einbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren an neu synthetisierten Phospholipiden führen [zitiert nach 123]. LPLAT7 katalysiert die Reacylierung von Lysophosphatidylinositol (LPI) zu Phosphatidylinositol (PI; ein Phosphoglycerid), in dem es eine Fettsäure in Beisein von Acyl-Coenzym A als Acylgruppen-Donor den Phospholipiden hinzufügt [123]. Außerdem konnte eine Aktivität der LPLAT7 in den inflammatorisch wirkenden neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, wo sie eine wichtige Rolle des Arachidonsäure-Metabolismus innehat [42]. Sie reguliert die Menge an freier Arachidonsäure, indem sie sie in die Phospholipide einfügt. Somit ist Arachidonsäure nicht mehr für die Synthese der Leukotriene verfügbar, die eine Inflammation in Hepatozyten und anderen Organen verstärken. Die untersuchte Mutation des Enzyms von *TM6SF2* verringert die Sekretion von VLDL, welche Triacylglyceride und Cholesterin in extrahepatische Gewebe transportieren. Aufgrund des veränderten Allels sind ein erhöhter Triglyceridgehalt in den Hepatozyten und ein verringerter Gehalt an Serumlipiden bei homozygoten Trägern messbar [30,65], was das Risiko einer hepatischen Inflammation und Steatose steigert.

**Tabelle 15:** Häufigkeit der Genotypen von *PNPLA3* (rs738409), *MBOAT7* (rs641738), *TM6SF2* (rs58542926)

	Allelfrequenz der Genotypen (%)		
	<i>PNPLA3</i>	<i>MBOAT7</i>	<i>TM6SF2</i>
<b>Major</b>	25 (0,73)	8 (0,39)	38 (0,92)
<b>Heterozygot</b>	16	19	7
<b>Minor</b>	4 (0,27)	18 (0,61)	0 (0,08)

- Vitamin D

Tabelle 16 listet die Ergebnisse der Genotypisierung von sechs Genen auf, die Polymorphismen aufweisen, die die Serumkonzentrationen von 25(OH)-Vitamin-D negativ beeinflussen. Sie wurden assoziiert mit dem Vitamin D-Metabolismus, dem Transport, der Synthese sowie Inaktivierung und der Elimination von Vitamin D.

**Tabelle 16:** Häufigkeit der Genotypen von *AMDHD1* (rs10745742), *CYP24A1* (rs17216707), *SEC23A* (rs8018720), *GC* (rs7041), *DHCR7* (rs12800438), *CYP2R1* (rs10741657)

	Allelfrequenz der Genotypen (%)					
	<i>AMDHD1</i>	<i>CYP24A1</i>	<i>SEC23A</i>	<i>GC</i>	<i>DHCR7</i>	<i>CYP2R1</i>
<b>Major</b>	16 (0,58)	29 (0,82)	32 (0,86)	7 (0,46)	21 (0,7)	19 (0,67)
<b>Heterozygot</b>	20	16	13	27	21	22
<b>Minor</b>	9 (0,42)	0 (0,18)	0 (0,14)	11 (0,54)	3 (0,3)	4 (0,33)

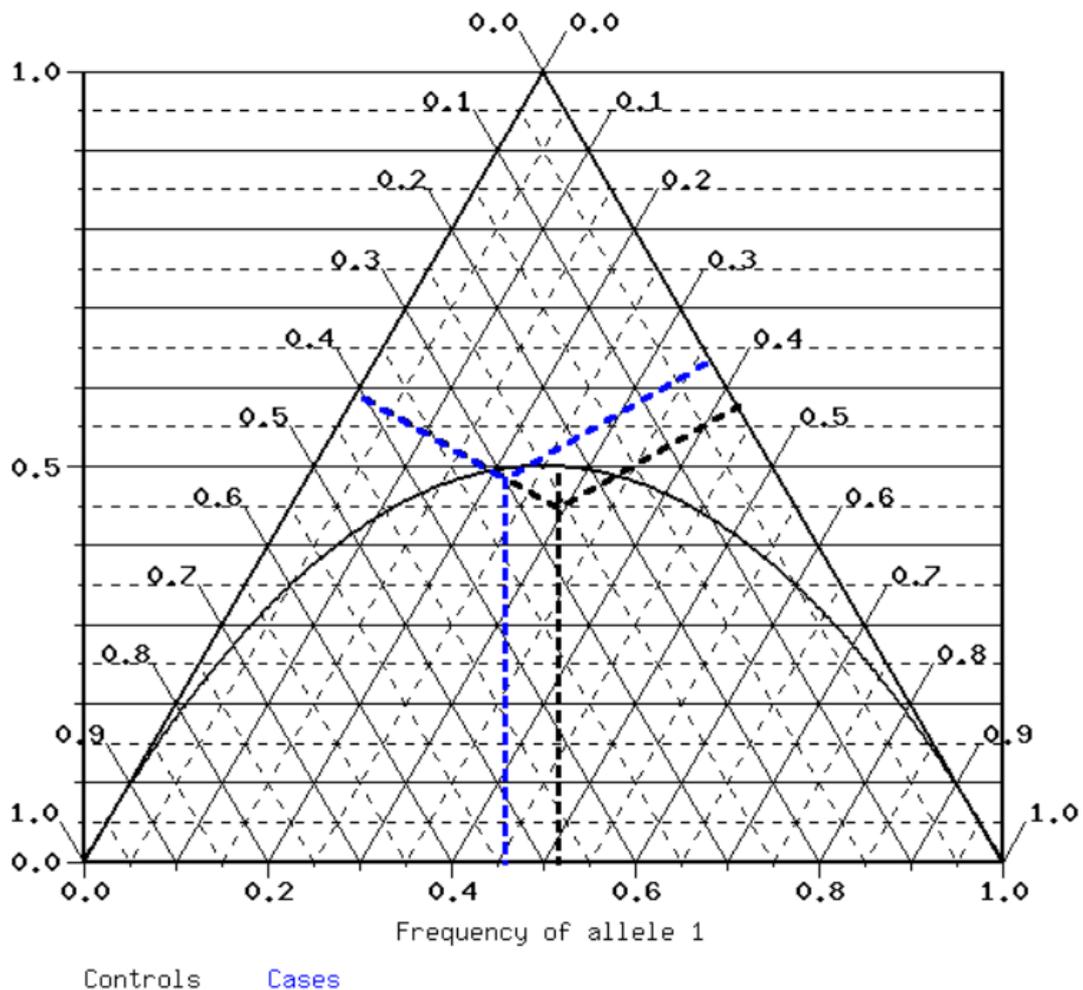
#### 4.4.2 Prüfung der Genotypen auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium

Das populationsgenetische Gesetz von Hardy und Weinberg beschreibt die Häufigkeiten von autosomal-rezessiv vererbten Genotypen. Mit dessen Hilfe kann abgeschätzt werden, wie groß der Anteil von homozygoten und heterozygoten Trägern eines veränderten Allels in der Bevölkerung ist. Nach dem Gesetz bleibt die Frequenz bestimmter Allele in einer Population über Generationen gleich. Es müssen dafür folgende Voraussetzungen der *idealen* Population erfüllt sein: Panmixie, große Population, gleichwertige Allele, keine evolutionären Veränderungen wie Mutation, Selektion, Drift oder Migration [3].

Die Allelfrequenzen werden wie folgt berechnet: In der Ausgangsüberlegung besitzt ein Genlocus zwei mögliche Allele: P und Q. Das Allel P habe die Allelfrequenz  $p$  und das Allel Q die Allelfrequenz  $q$ . Es gilt  $p + q = 1$ . Als autosomales Gen liegt es beim Menschen in zwei Kopien vor, so dass  $(p+q)^2 = 1$ . Anhand der Binominalbeziehung kann nun auf die Häufigkeit der drei möglichen Genotypen geschlossen werden:  $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Ein homozygoter Träger des P-Allels (P/P) tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p^2$  auf. Ein homozygoter Träger des Q-Allels (Q/Q) tritt mit der Wahrscheinlichkeit von  $q^2$  auf und ein heterozygoter Träger (P/Q) besitzt die Wahrscheinlichkeit von  $2pq$ .

Für unsere Analysen wurde die Hardy-Weinberg-Analyse eingesetzt, um die Kohorte auf Abweichungen von dem Gleichgewicht zu testen. Liegt beispielsweise ein Homozygotenexzess vor, dann ist eine der oben beschriebenen Voraussetzungen nicht gegeben oder es liegen Genotypisierungsfehler vor. Die Nullhypothese  $H_0$  ist, dass unsere analysierten Homozygoten- und Heterozygotenfrequenzen mit den nach der Hardy-Weinberg-Verteilung erwarteten Frequenzen übereinstimmen. Die Alternativhypothese  $H_1$  indes ist, dass eine Abweichung zwischen beobachteten und erwarteten Zahlen aufgetreten ist. Beide Hypothesen werden zweiseitig geprüft.

Graphisch dargestellt wurden die Analysen im De Finetti-Diagramm, welches am Beispiel der *SERPINA1*-Allele erläutert werden soll (Abbildung 37):



**Abbildung 37:** De Finetti-Diagramm mit SERPINA1-Allelfrequenzen und Genotypenfrequenzen bei COVID19-Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz).

- Ergebnisse der Hardy-Weinberg-Analyse

Die Überprüfung auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde für alle SNPs der Patienten durchgeführt. Als Kontrollgruppe diente eine Kohorte mit 252 Blutspendern aus Leipzig, bei denen Erkrankungen ausgeschlossen sind. Es zeigten sich in der Studienkohorte keine Abweichungen der Genotyphäufigkeiten homozygot Wildtyp, heterozygot und homozygot Minor von der gemäß Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Verteilung der Risikogene (alle  $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse der Genotypenverteilung wurden mit den Ergebnissen der Genotypenverteilung der Kontrollkohorte verglichen. Dabei ergab sich eine Abweichung bei der Variante des *MBOAT7*-Gens, deren Auswertungsdaten der Tabelle 17 zu entnehmen sind. Um die gemessene Verteilung von der zu erwartenden Verteilung in Orientierung an die Kontrollkohorte zu vergleichen, wurde der Pearson Chi-Quadrat-Test angewandt. Das Risikoallel 1 entspricht dem Majorallel und das Risikoallel 2 dem Minorallel. Somit gibt „n1“ die Frequenz des WT-Genotyps, „n12“ die Häufigkeit der heterozygoten Genotyps und „n22“

die Frequenz der Genotypvariante an. Unterschiedliche Verteilungen kommen vor bei der Allelfrequenz (common odds ratio), der Gegenüberstellung der Homozygoten und der Gegenüberstellung von Wildtyp und Heterozygoten zusammengenommen mit Homozygoten des Minorallels.

**Tabelle 17:** Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die *MBOAT7*-Variante

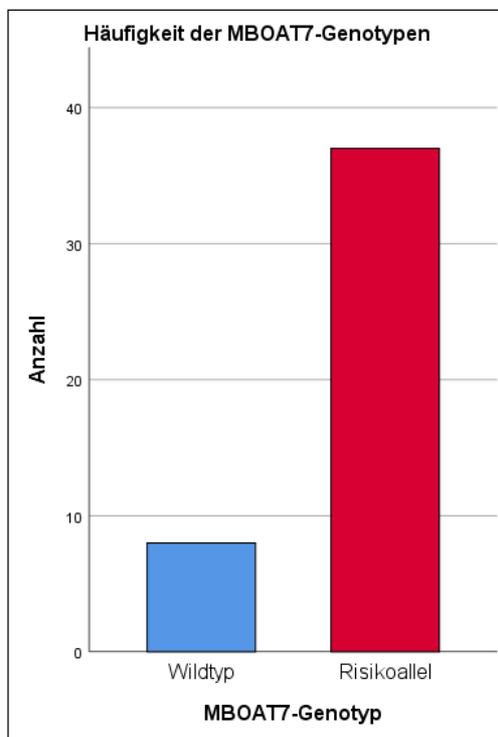
Kontrollen	COVID19-Kohorte	Risikoallel 2 $\triangleq$ Minorallel				
		n11=71 n12=102 n22=37 p=0,97 (Pearson)	n11=12 n12=31 n22=17 p=0,75 (Pearson)	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]
		p=0,02	p=0,11	p=0,02	p=0,04	p=0,02
		Risikoallel 1 $\triangleq$ Majorallel				
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
		p=0,02	p=0,25	p=0,02	p=0,04	p=0,02

Außerdem sind Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht innerhalb der Kontrollkohorte bei den Genvarianten von *TM6SF2*, *AMDHD1*, *SEC23A* und *DHCR7* vorhanden.

#### 4.4.3 Korrelationen des *MBOAT7*-Risikoallels mit Outcome und Leberparametern

Aufgrund der Abweichung der Allelfrequenz der Genvariante *MBOAT7* von der Kontrollkohorte werden die homozygoten und heterozygoten Träger des Risikoallels im Folgenden gesondert ausgewertet. Gezielt soll hierbei auf Korrelationen mit pathologischen Leberwerten, dem Outcome und dem Alter der Patienten getestet werden. Des Weiteren wird der Verlauf signifikant unterschiedlicher Leberparameter graphisch dargestellt und verglichen. Von insgesamt 45 Patienten konnte bis dato die Genotypisierung für *MBOAT7* rs641738 durchgeführt werden, sodass die restlichen 16 Patienten aus dieser Analyse ausgeschlossen wurden.

- Deskription der Kohorte der Genotypisierung von rs641738 (*MBOAT7*)



**Abbildung 38:** Häufigkeit der *MBOAT7*-Genotypen

**Tabelle 18:** Ergebnisse der Genotypisierung

Genotyp	Anzahl der Patienten
Wildtyp	8
Risikoallel Heterozygot	19
Risikoallel Homozygot	18

- Case-Control-Matching

Etablierte Risikofaktoren für eine SARS-Cov-2-Infektion sind erhöhtes Alter und das männliche Geschlecht [32,127]. Um mögliche Auswirkungen dieser Risikofaktoren beurteilen zu können, wurde mittels der Kontrollkohorte ein Case-Control-Matching nach Alter ( $\pm 10\%$ ) und nach Geschlecht durchgeführt. Der McNemar-Test wurde anschließend angewandt, um die Häufigkeitsverteilung des *MBOAT7*-Risikoallels zwischen der COVID-19-Kohorte und der Kontrollkohorte zu vergleichen.

Nach einem 1:1-Matching nach Alter konnten 22 Patienten einer gleichaltrigen Kontrollperson zugeordnet werden. Mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  zeigt der McNemar-Test ein häufigeres Auftreten des *MBOAT7*-Risikoallels in der COVID-19-Kohorte an. Um die Gruppengröße zu erhöhen wurde zusätzlich ein 2:1-Matching mit dem Chi-Quadrat-Test für 44 Patienten durchgeführt (unverbundener Test wegen der stark ungleichen Geschlechterverteilung), der ebenfalls einen signifikanten Unterschied zeigte ( $p < 0,05$ ). Ein 1:1-Matching nach männlichem Geschlecht dagegen ergab bei 28 gematchten Männern keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,15$ ).

Schließlich wurde ein kombiniertes Matching nach Alter und Geschlecht durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung beider Risikofaktoren auszuschließen. Die Möglichkeiten des Zuordnens waren daher stärker begrenzt, sodass ein McNemar-Test mit 16 Personen durchgeführt werden konnte. Eine exakte Signifikanz von  $p = 0,03$  zeigt auch hier einen Unterschied in der Häufigkeitsverteilung des *MBOAT7*-Risikogens an.

- Korrelation zwischen *MBOAT7*-Risikoallel und Patientencharakteristika und Outcome

Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurde überprüft, ob das Risikoallel von *MBOAT7* mit dem Geschlecht oder Alter der Patienten (<65 Jahre vs. >65 Jahre) assoziiert ist. Mit p-Werten größer als 0,05 zeigt sich keine signifikante Korrelation.

Ob bei Aufnahme der Patienten ins Krankenhaus ein pathologischer Leberwert vorlag, wurde definiert als das Überschreiten des ULN von mindestens einem Leberparameter (AST, ALT, AP, TBIL,  $\gamma$ -GT, ALB oder INR) und als nominale Variable hinzugefügt. Mit einem p-Wert von 0,01 im Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten des *MBOAT7*-Risikoallels und einem pathologischen Leberwert bei Aufnahme (Abbildung 39).

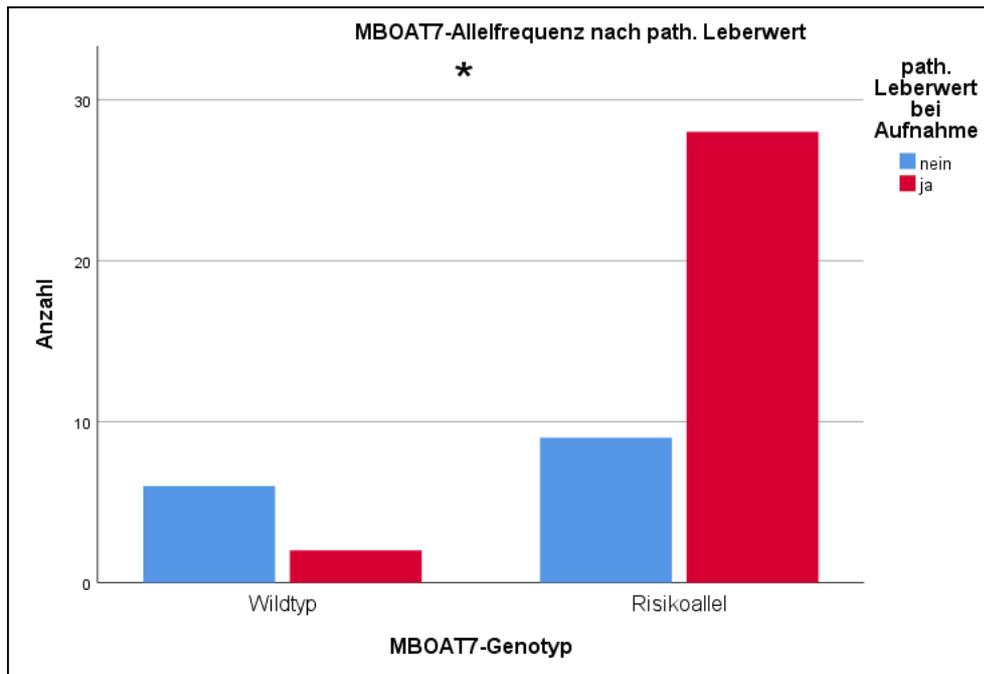


Abbildung 39: Patientenanzahl mit pathologischen Leberparametern am Aufnahmetag *MBOAT7*-Risikoallel

Des Weiteren wurde auf Korrelation zwischen einem negativen Outcome, d.h. mit der Entwicklung einer COVID-19-Pneumonie, Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Versorgung auf der ICU, Beatmungspflichtigkeit, ECMO-Therapie oder Versterben und dem *MBOAT7*-Risikoallel überprüft. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wurde auf eine statistische Analyse verzichtet, weswegen die Beschreibung im Folgenden eine explorative Analyse darstellt. 78% (29/37) der *MBOAT7*-Risikoallelträger entwickelten im Verlauf der Krankheit eine COVID-19-Pneumonie, im Vergleich zu lediglich 50% (4/8) der Nicht-Risikoallelträger (Abbildung 40). Mit Blick auf die Patienten auf der ICU im Vergleich zur M-INT1 wird deutlich, dass 94% (17/18) Träger der *MBOAT7*-Variante sind. Der Anteil ist mit 74% (20/27) unter den Patienten auf der Normalstation deutlich geringer (Abbildung 41). Trotz der noch geringeren Anzahl an Patienten, die eine invasive Beatmung während ihres Krankenhausaufenthaltes benötigten, zeigt sich auch in dieser Kategorie ein häufigeres Auftreten der Allelvariante als bei Patienten, die nicht maschinell beatmet wurden. 93% (14/15) der beatmeten Patienten waren Träger mindestens eines Risikoallels, während 77% (23/30) mit Risikoallel keine maschinelle Beatmung benötigten (Abbildung 42). Jeder der fünf Patienten (100%) mit zusätzlicher ECMO-Therapie trug mindestens eine Kopie des *MBOAT7*-Minorallels. Zum Zeitpunkt des Studienschlusses sind 22% (8/37) der Patienten mit ebendiesem *MBOAT7*-Allel und 25% (2/8) der Patienten ohne verstorben. Unter den Verstorbenen finden sich somit 80% (8/10) mit dem *MBOAT7*-Risikoallel und 20% (2/8) mit dem Wildtypallel (Abbildung 43).

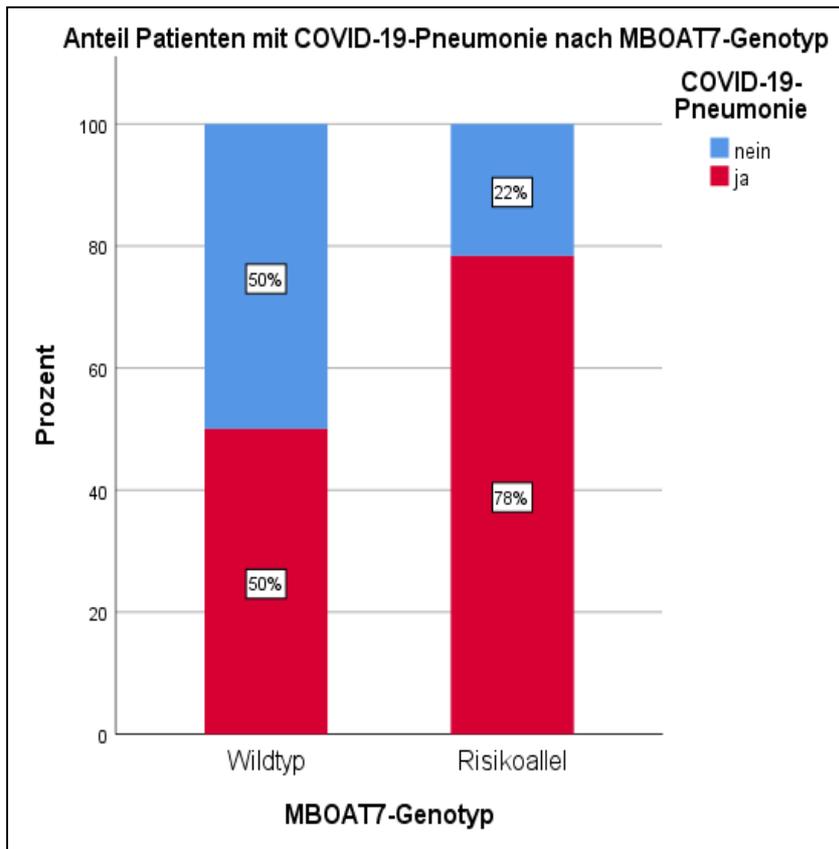


Abbildung 40: Anteil der Patienten mit Covid-19-Pneumonie nach *MBOAT7*-Genotyp

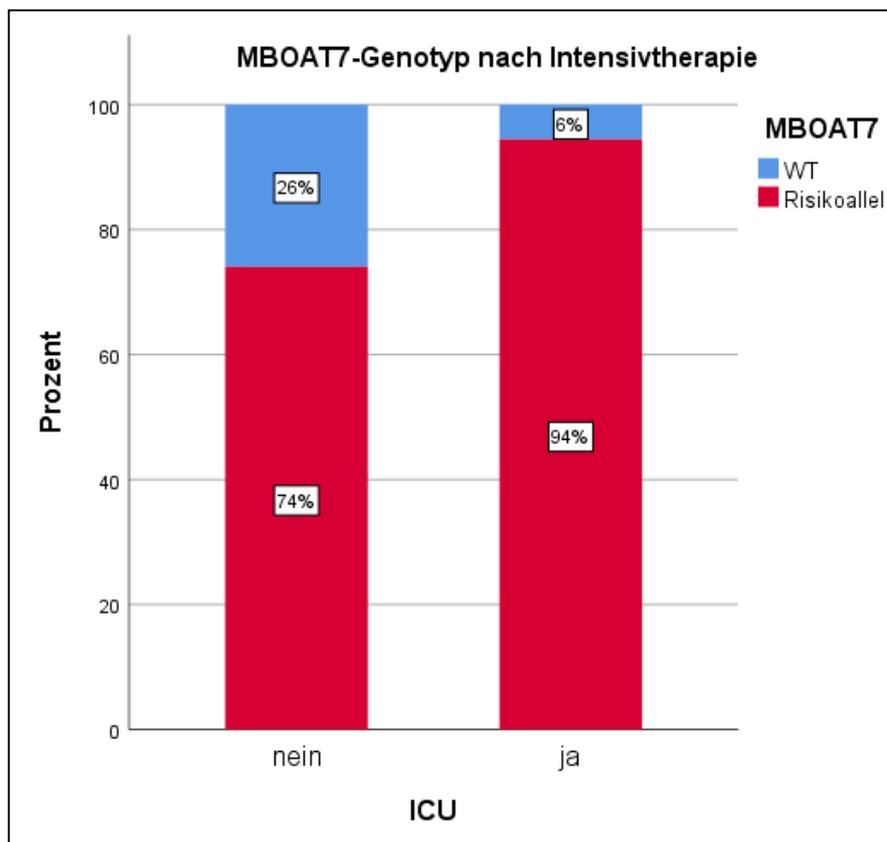


Abbildung 41: Prozentualer Anteil des *MBOAT7*-Genotyps nach intensivmedizinischer Behandlung

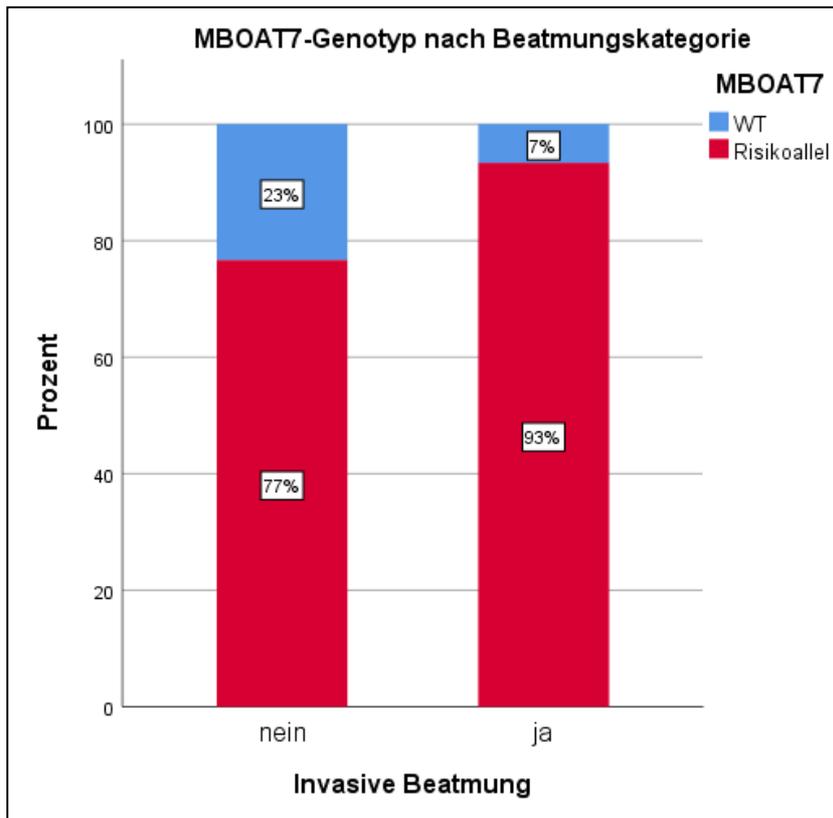


Abbildung 42: Prozentualer Anteil des *MBOAT7*-Genotyps nach invasiver Beatmung

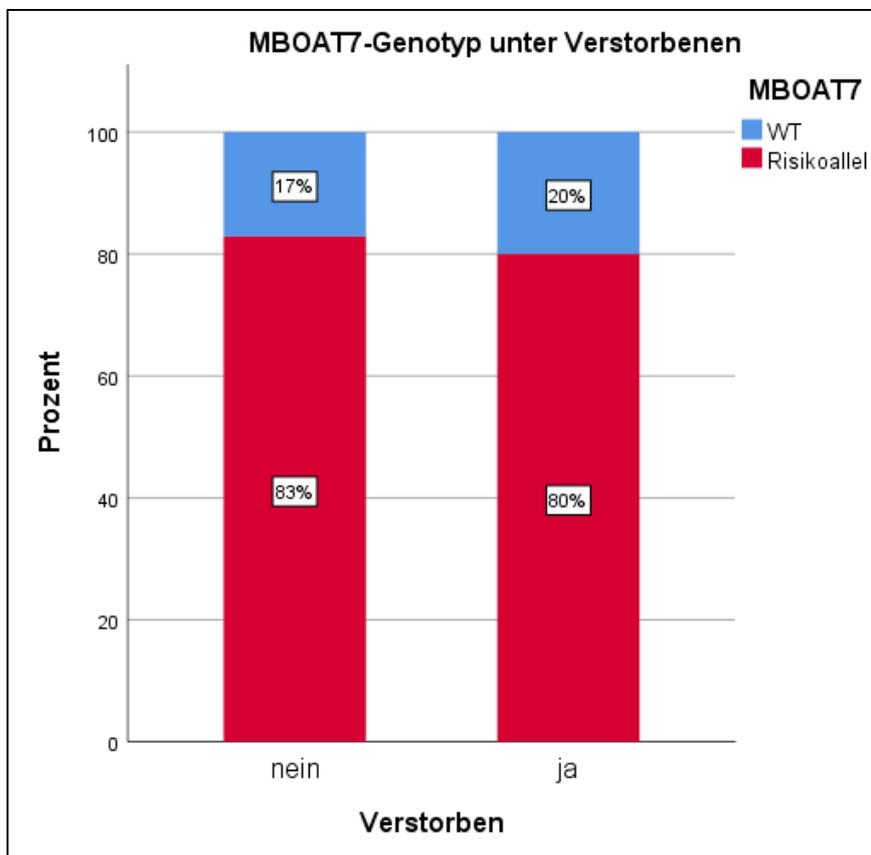
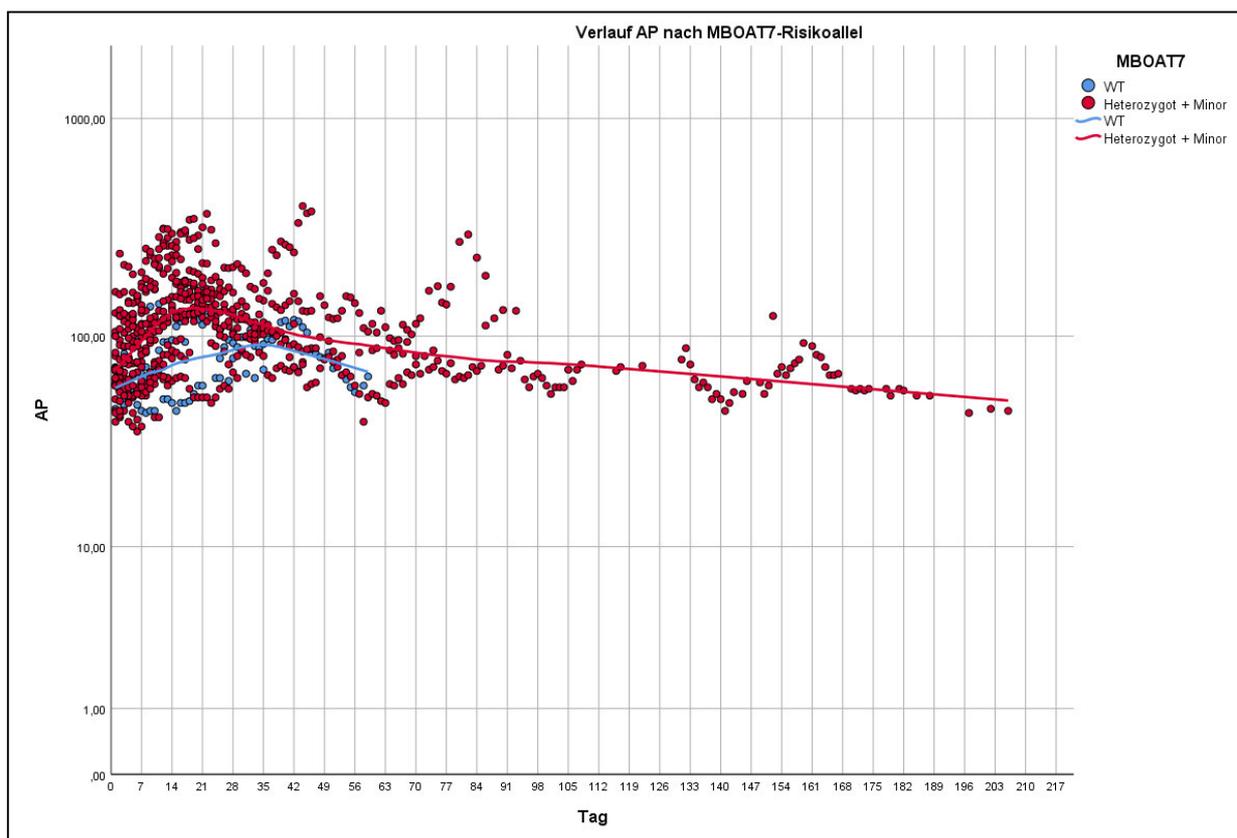


Abbildung 43: Prozentualer Anteil des *MBOAT7*-Genotyps unter den verstorbenen Patienten

- Korrelation zwischen Risikoallel von *MBOAT7* und Leberwerten

Die Analyse des Mann-Whitney-U-Tests zeigt eine Korrelation zwischen dem *MBOAT7*-Risikoallel und erhöhten Werten von AP ( $p = 0,002$ ),  $\gamma$ -GT ( $p = 0,009$ ), ALT ( $p = 0,003$ ) und Bilirubin ( $p < 0,001$ ) sowie erniedrigte Albumin-Konzentrationen im Serum ( $p < 0,001$ ). Diese Leberparameter wurden genauer charakterisiert, indem graphisch die Loess-Regressionskurven der zeitlichen Verläufe von Patienten mit dem Wildtyp-Allel und der Allelvariante vergleichend gegenübergestellt wurden. Abbildung 44 zeigt in einem Streudiagramm den zeitlichen Verlauf der Schwankungen der AP-Aktivitäten aller mit COVID-19 hospitalisierten Patienten, die genotypisiert wurden. Insgesamt wurden 739 AP-Werte von 45 Patienten analysiert und logarithmisch skaliert aufgetragen. Die roten Punkte und der rote Loess-Graph sind Werte von Minorallelträgern, während die blauen Punkte mit ihrem blauen Loess-Graph die Werte von Wildtypallelträgern illustrieren. Auffallend ist, dass 16 von 37 (43%) Risikoallelträger und nur zwei von acht Wildtypallelträger (25%) abnorme AP-Werte über dem ULN aufwiesen ( $\text{♂} > 129 \text{ U/l}$ ;  $\text{♀} > 104 \text{ U/l}$ ). Der Median von 72 U/l (Min=42 U/l; Max=141 U/l) der Wildtypallelträger ist niedriger als der Median von 100 U/l (Min=36 U/l; Max=397 U/l) der Risikoallelträger.



**Abbildung 44:** Verlauf AP nach *MBOAT7*-Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen

Abbildung 45 zeigt den zeitlichen Verlauf der Schwankungen der  $\gamma$ -GT-Aktivitäten aller mit COVID-19 hospitalisierten Patienten, die genotypisiert wurden. Insgesamt wurden 758  $\gamma$ -GT-Werte von 45 Patienten analysiert und logarithmisch skaliert aufgetragen. 25 von 37 (68%) Risikoallelträger und fünf von acht Wildtypallelträger (63%) überschritten während ihrer Stationierung den ULN von  $\gamma$ -GT ( $\text{♂} >60 \text{ U/l}$ ;  $\text{♀} >40 \text{ U/l}$ ). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Serumkonzentrationen der Wildtypallelträger (Median=50; Min=11, Max=184) und der Risikoallelträger (Median=81; Min=4; Max=782).

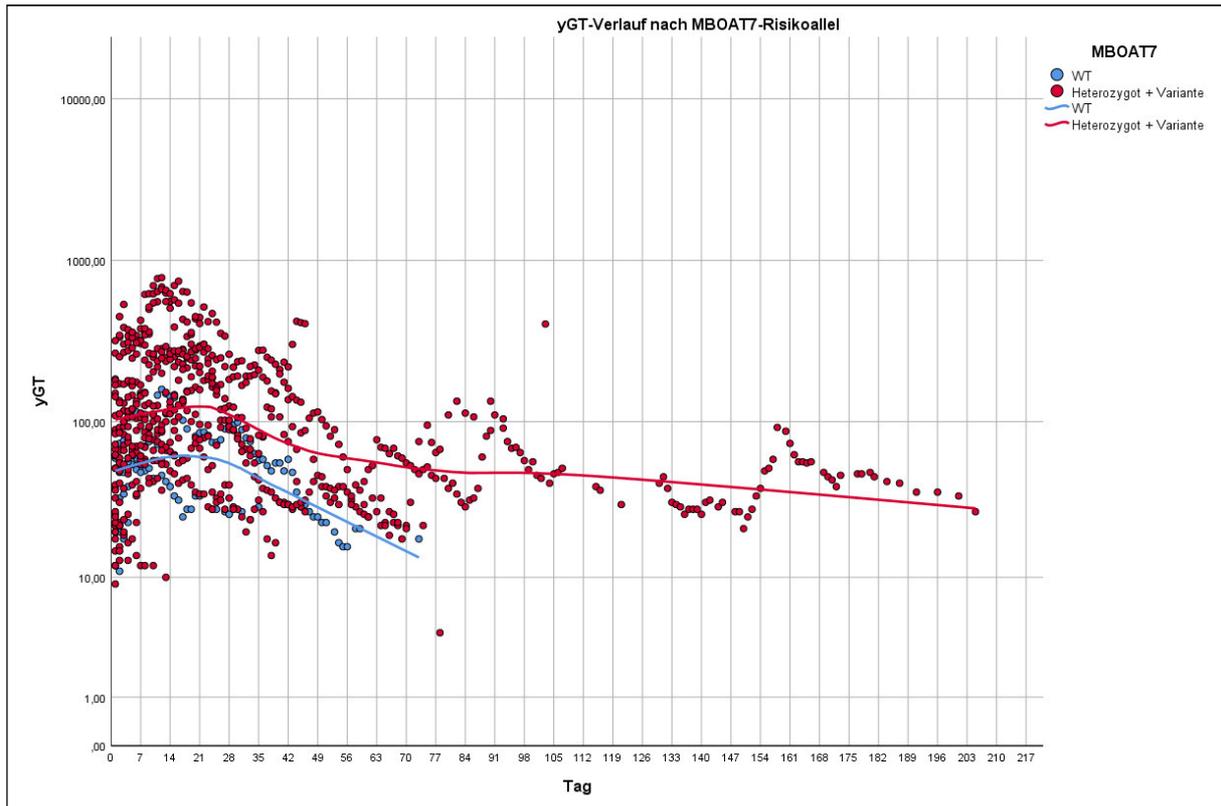
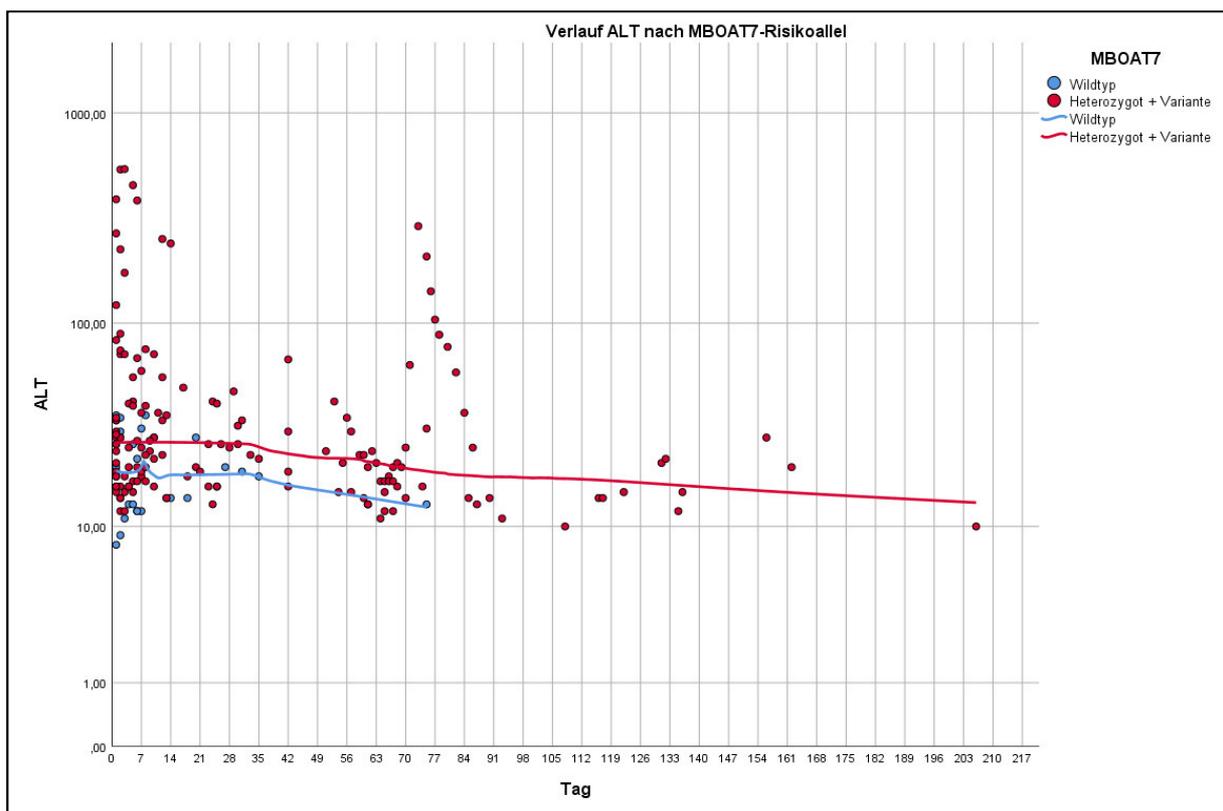


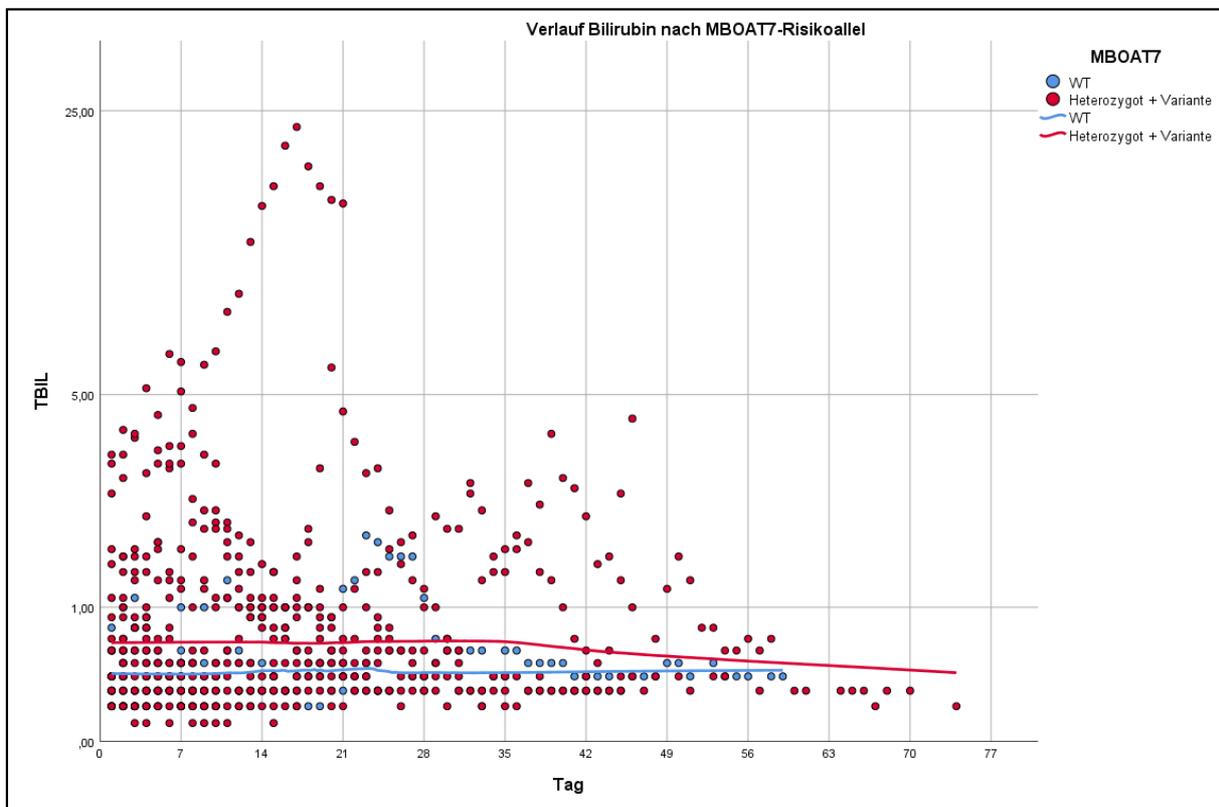
Abbildung 45:  $\gamma$ -GT-Verlauf geschichtet nach *MBOAT7*-Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen.

Der Verlauf der ALT-Werte über die Zeit aufgetragen wird in Abbildung 46 demonstriert. Die ALT wurde weniger häufig und nicht bei allen Patienten bestimmt, was der Grund für die lichtere Punktwolke in diesem Streudiagramm ist. Auf insgesamt 184 Werte konnte zurückgegriffen werden, die ebenfalls auf Basis des *MBOAT7*-Genotyps geschichtet dargestellt wurden. Unter den Patienten, die Träger mindestens eines Minorallels sind, überstiegen 15 von 37 (41%) das ULN der ALT und 6 von 36 (17%) das zweifache ULN ( $\text{♂} >100 \text{ U/l}$ ;  $\text{♀} >70 \text{ U/l}$ ). Unter den Wildtypallelträgern waren es lediglich 25% (2/8), die das einfache ULN und keiner, der das zweifache ULN überstiegen haben. Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,02$ ) zwischen den Serumkonzentrationen der Wildtypallelträger (Median=18; Min=8, Max=36) und der Risikoallelträger (Median=23; Min=10; Max=541).



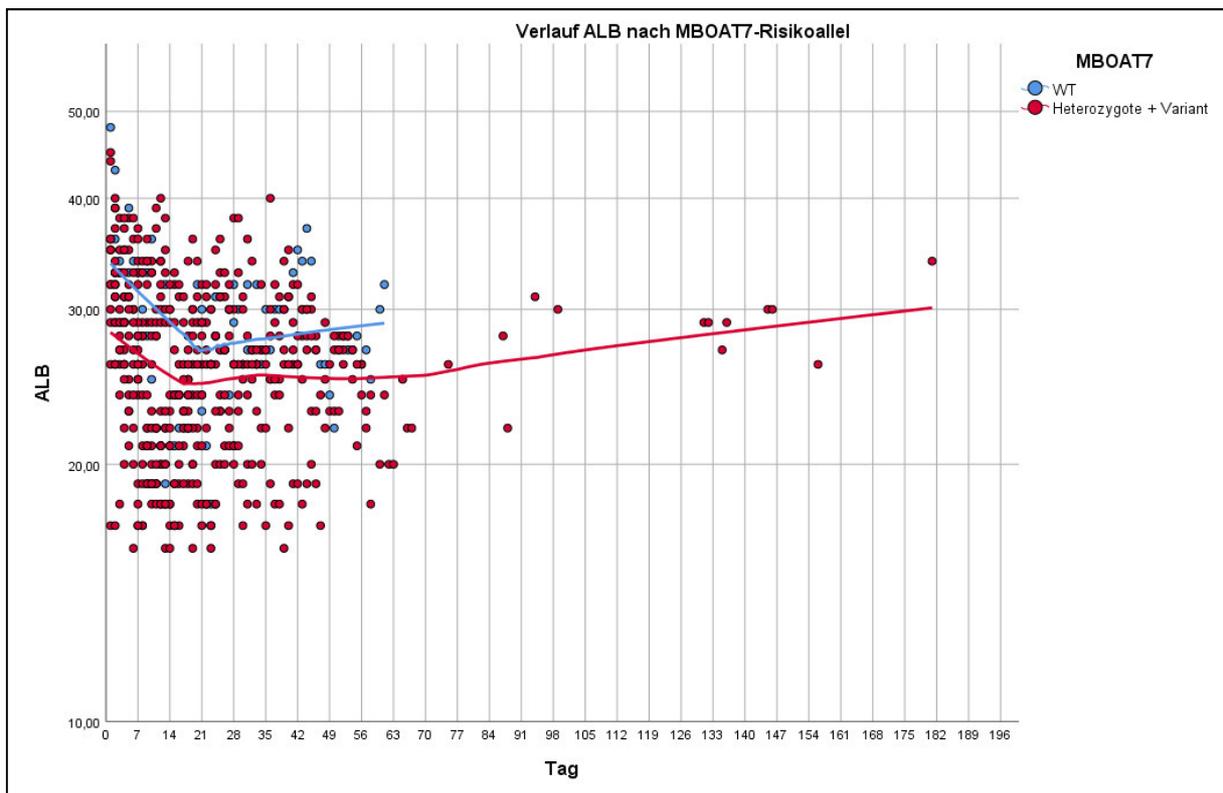
**Abbildung 46:** ALT-Verlauf geschichtet nach *MBOAT7*-Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen

Das Streudiagramm in Abbildung 47 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluktuationen aller Bilirubin-Konzentrationen, die von den hospitalisierten COVID-19-Patienten erfasst wurden. Insgesamt wurden 596 Bilirubin-Werte von 45 Patienten analysiert und logarithmisch skaliert aufgetragen. Der Unterschied zwischen den beiden Genotypengruppen ist, gemessen an der Tatsache, ob der Wert jemals den ULN ( $>1,2$  mg/dl) übersteigt, nicht so stark ausgeprägt, wie bei den vorangegangenen Parametern. Zwei von acht (25%) der Majorallelträger und zehn von 37 (27%) der Risikoallelträger präsentierten zu einem Zeitpunkt ihres Krankenhausaufenthaltes Werte über dem oberen ULN. An der roten Loess-Kurve (Positivität für das Risikoallel) kann ebenfalls abgelesen werden, dass ein Großteil der Werte sich im unauffälligen Bereich unter dem ULN befindet. Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Serumkonzentrationen der Wildtypallelträger (Median=0,4; Min=0,2, Max=1,9) und der Risikoallelträger (Median=0,6; Min=0,1; Max=22,9).



**Abbildung 47:** Bilirubin-Verlauf geschichtet nach *MBOAT7*-Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen

Abbildung 48 zeigt den zeitlichen Verlauf der Wertschwankungen von Albumin aller mit COVID-19 hospitalisierten Patienten, die genotypisiert wurden. Insgesamt wurden 536 Werte von 45 Patienten analysiert und logarithmisch skaliert aufgetragen. Deutlich wird bereits bei Betrachtung beider Loess-Regressionskurven, dass die Mehrheit der Werte unter dem unteren Grenzwert (engl. *lower limit of normal*; LLN) von 35g/l liegt. 20 von 37 (54%) Risikoallelträgern und fünf von acht Wildtypallelträgern (63%) unterschritten während ihrer stationären Behandlung den LLN von Albumin (< 35g/l). Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Serumkonzentrationen der Wildtypallelträger (Median=30 g/l; Min=18 g/l, Max=48 g/l) und der Risikoallelträger (Median=26 g/l; Min=16 g/l; Max=45 g/l).



**Abbildung 48:** Albumin-Verlauf geschichtet nach *MBOAT7*-Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen

- Vergleich der Altersgruppen <65Jahre und >65 Jahre nach *MBOAT7*-Genotyp, Outcome und Leberparameter [44]

Die Analyse des Chi-Quadrat-Tests zeigt keine Korrelation zwischen dem *MBOAT7*-Risikoallel und dem Alter, während das Versterben mit einem Alter über 65 Jahren korreliert ( $p = 0,17$ ). Patienten älter als 65 Jahre hatten ein höheres Risiko zu versterben als Patienten, die jünger als 65 Jahre sind.

- Korrelation zwischen Risikoallel von *MBOAT7* und Entzündungsmarkern

Neben den Leberparametern wurden die drei systemischen Entzündungsmarker CRP, LDH und IL-6 auf einen Zusammenhang zum *MBOAT7*-Risikoallel getestet. Mittels einer Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*; ANOVA) wurde ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) der CRP-Konzentrationen zwischen homozygoten Trägern des Wildtypallels, heterozygoten und homozygoten Trägern des Risikoallels gefunden. Der zeitliche Verlauf dieser Werte ist in dem gruppierten Streudiagramm in Abbildung 49 zu sehen. Jedoch sind die höchsten CRP-Werte nicht dem Risikoallel, sondern dem Wildtyp zuzuordnen, was an der blauen und roten Kurve abzulesen ist. Der Mittelwert der Wildtyp-Gruppe beträgt 139 mg/l, der Mittelwert der Heterozygoten 84 mg/l und der der homozygoten Minorallelträger 106 mg/l. Kein Zusammenhang ist bei den Serumwerten von IL-6 und LDH zu sehen ( $p > 0,05$ ).

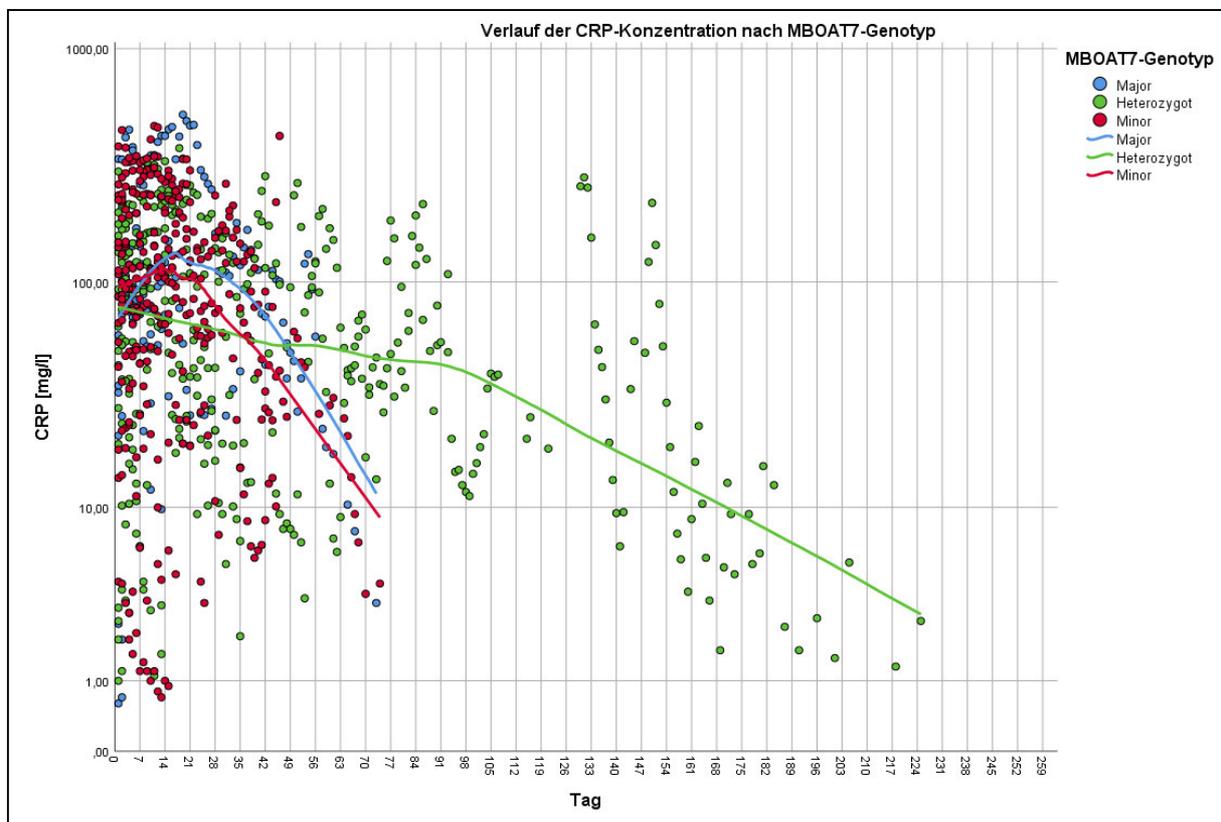


Abbildung 49: Verlauf der CRP-Konzentration nach *MBOAT7*-Genotyp

#### 4.4.4 Kombinierte Analyse der SNPs im *MBOAT7*-, *PNPLA3*- und *TM6SF2*-Gen

In toto wurden drei SNPs in Risikogenen für eine Steatose untersucht, von denen als Einziger der SNP im *MBOAT7*-Gen mit pathologischen Leberparametern in Verbindung gebracht werden konnte. Von Interesse ist jedoch nicht nur eine einzige Allelvariante, sondern die Kombination aus den Allelvarianten eines Patienten, die wiederum in Verbindung mit pathologischen Leberwertkonzentrationen sowie systemischen Entzündungsmarkern gebracht wurde. Dies wurde mit einer multiplen ANOVA getestet.

Je nach Anzahl der summierten Minorallele innerhalb der drei SNPs im *MBOAT7*-, *PNPLA3*- und *TM6SF2*-Gen wurden die Patienten fünf Kategorien zugeordnet:

**Tabelle 19:** Patientenanzahl nach Anzahl der Risikoallele im *MBOAT7*-, *PNPLA3*- und *TM6SF2*-Gen

Anzahl Risikoallel	Kategorie	n
0	0	6
1	1	8
2	2	19
3	3	8
4	4	4

Anhand der multiplen ANOVA konnte ein signifikanter Anstieg der Maximalwerte der Cholestasemarker  $\gamma$ -GT ( $p = 0,03$ ) und AP ( $p = 0,01$ ) mit der Anzahl der Risikoallele beobachtet werden. Dies ist graphisch in den folgenden Boxplots (Abbildungen 50 und 51) illustriert:

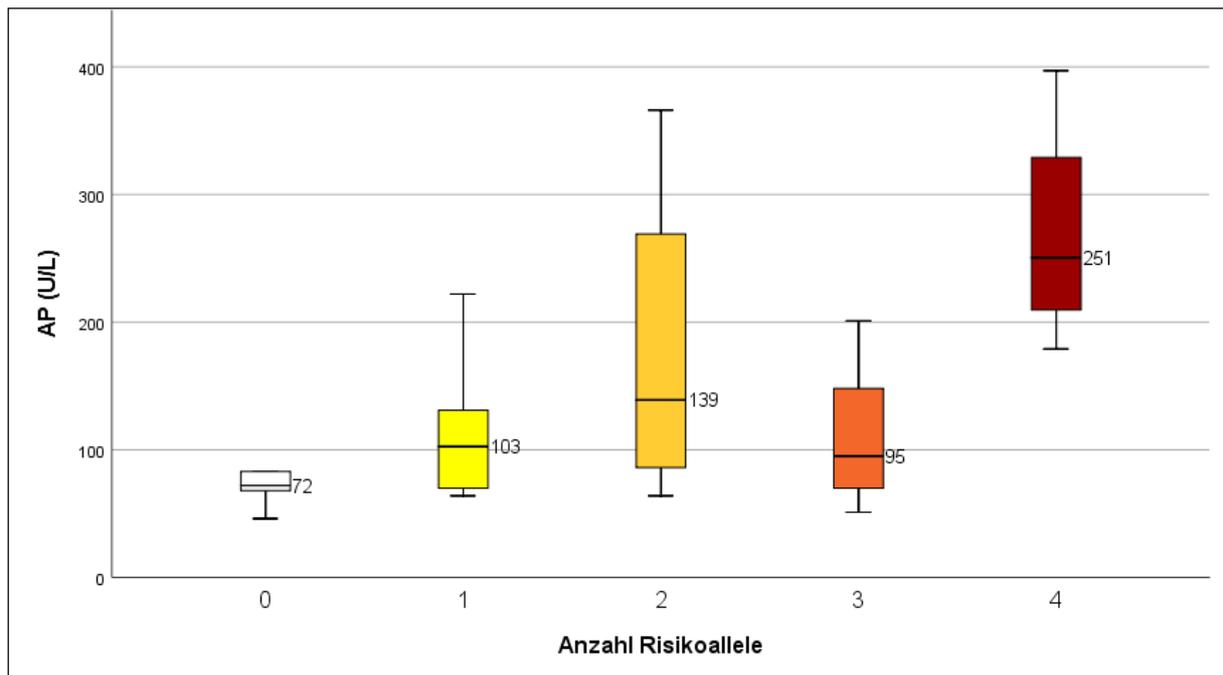


Abbildung 50: AP-Aktivität nach Anzahl der Risikoallele der Steatose-SNPs

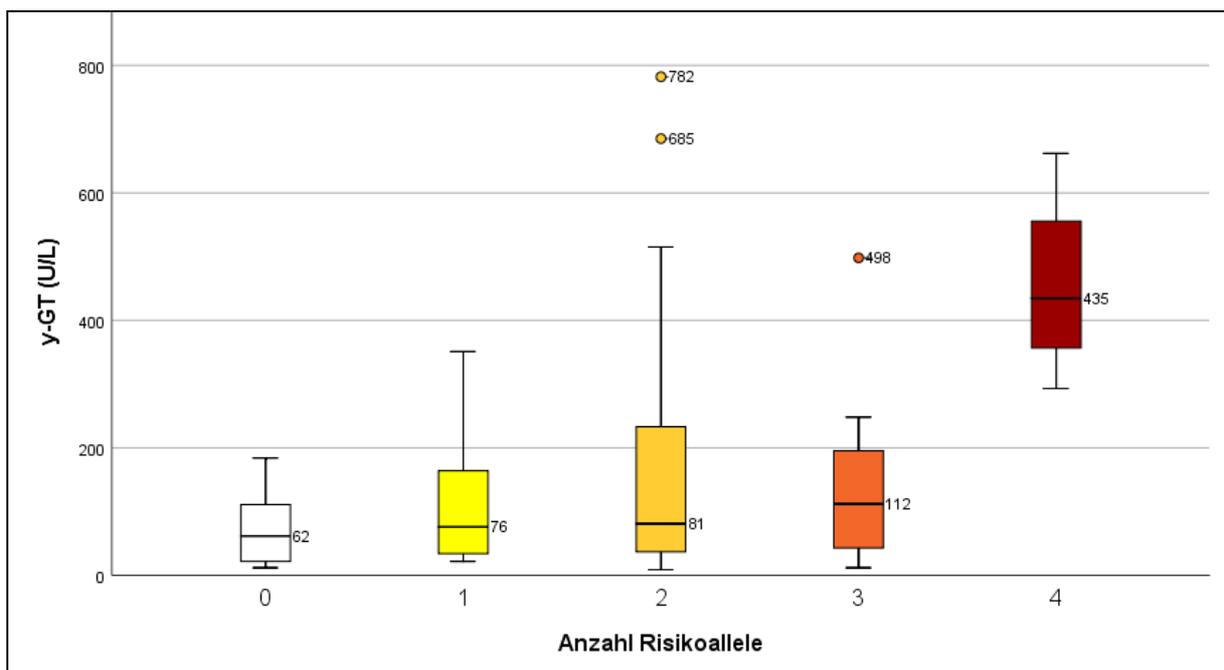


Abbildung 51:  $\gamma$ -GT-Aktivität nach Anzahl der Risikoallele der Steatose-SNPs

Im *t*-Test wurde die Kategorie 0 (kein Risikoallel) mit der Kategorie 4 (4 Risikoallele aus drei SNPs) verglichen, wobei ein signifikant erhöhter APRI-Score ( $p = 0,048$ ) sowie eine erhöhte IL-6-Konzentration ( $p = 0,006$ ) bei Patienten in Kategorie 4 nachgewiesen werden konnte. Die entsprechenden Boxplots veranschaulichen den Zusammenhang in den Abbildungen 52 und 53.

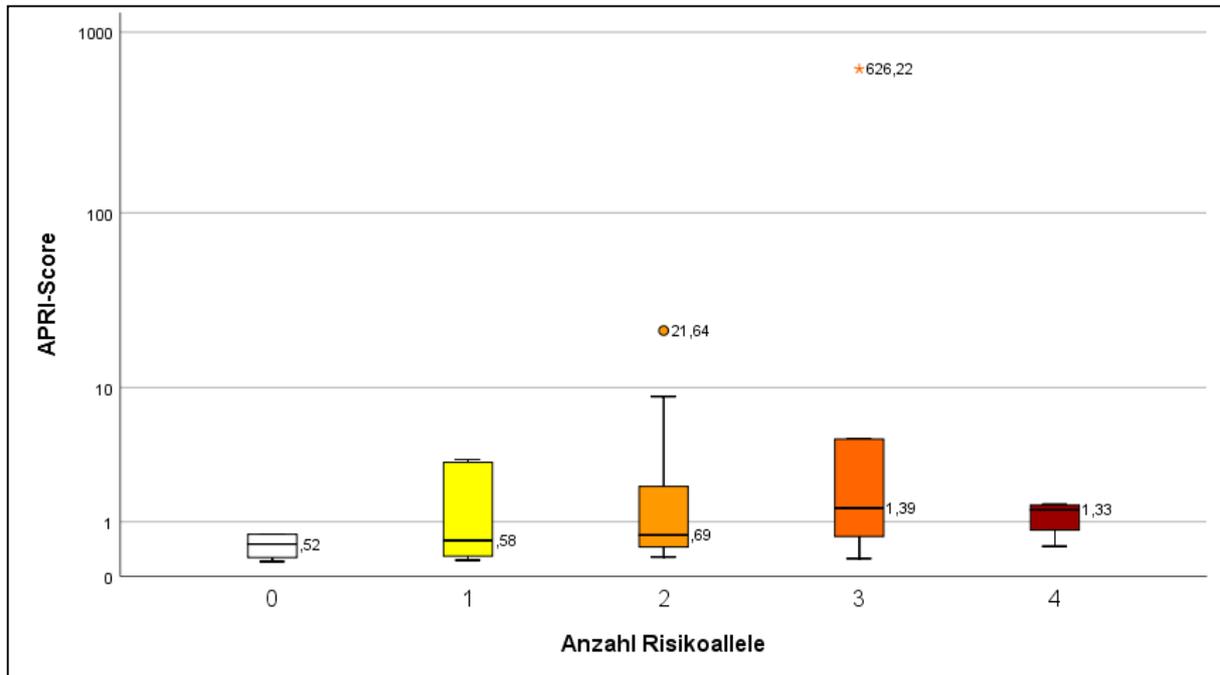


Abbildung 52: APRI nach Anzahl der Risikoallele

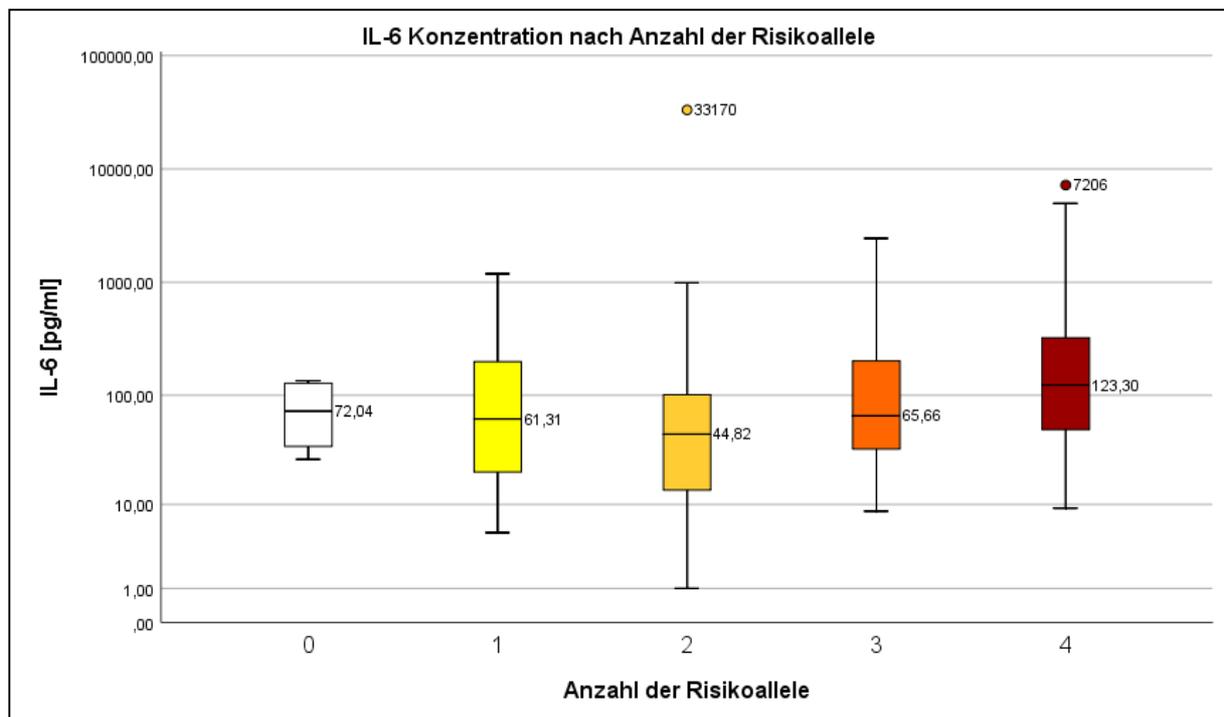


Abbildung 53: IL-6-Konzentration nach Anzahl der Risikoallele

## 4.5 AB0-Blutgruppenbestimmung

### 4.5.1 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung

Die Genotypvarianten des SNP rs8176719 zeigen den Blutgruppenstatus 0 an. Es handelt sich um die Deletion *c261delG*, die einen Kettenabbruch verursacht. Ein Träger von C an der Lokalisation hat dementsprechend entweder die Blutgruppe A oder B, während bei einer homozygoten Deletion die Blutgruppe 0 vorliegt. Der Basenaustausch von C zu T im SNP rs41302905 kodiert 02, das zweithäufigste Allel der Blutgruppe 0, während der SNP rs8176747 mit seinem Basenaustausch von C zu G dazu verwendet wurde, um auf die Blutgruppe B zu schließen. Es ergeben sich diese Allelkombinationen, um die Blutgruppen zu bestimmen:

- Diploide Allele 0101, 0102, 0202: Blutgruppe 0
- Diploide Allele B01, B02, BB: Blutgruppe B
- Diploide Allele A01, A02, AA: Blutgruppe A
- Diploides Allel AB: Blutgruppe AB

Der Tabelle 21 können die ermittelten Blutgruppen anhand der Basenkombinationen entnommen werden.

**Tabelle 20:** AB0-Blutgruppenbestimmung basierend auf DNA-Sequenzvariationsanalyse

Patientennummer	01: rs8176719	02: rs41302905	B: rs8176747	ABO Genotyp	Blutgruppe
Kontrolle BG A	C C	C C	C C	A01	A
Kontrolle BG 0	- -	C C	C C	001	0
Kontrolle BG B	- C	C C	C G	B01	B
Kontrolle BG AB	C C	C C	C G	A1B1	AB

Die Blutgruppenhäufigkeit ist hier in absoluten und relativen Zahlen angegeben und wird zusätzlich mit der Verteilung innerhalb der Kontrollkohorte verglichen. Die COVID-19-Gruppe weist eine Überrepräsentation der Blutgruppe 0 auf, ebenfalls im Vergleich zur deutschlandweiten relativen Verteilung der Blutgruppen (Blutgruppe 0  $\hat{=}$  41%).

**Tabelle 21:** Blutgruppenverteilung im Vergleich zur Kontrollkohorte

<b>Blutgruppe</b>	<b>COVID-19-Kohorte</b>	<b>Kontrollkohorte</b>
<b>A</b>	23 (40%)	105 (41%)
<b>0</b>	28 (48%)	101 (40%)
<b>B</b>	6 (10%)	35 (14%)
<b>AB</b>	1 (2%)	13 (5%)

#### 4.5.2 Korrelation zwischen Blutgruppen und Leberparametern

Die Geschlechterverteilung zwischen Blutgruppe A und den Blutgruppen 0, B und AB unterscheidet sich in dieser Arbeit nicht. Dies ist von Interesse, da die Grenzwerte der untersuchten Leberparameter nach Geschlecht variieren und so eine mögliche Verfälschung aufgrund physiologisch höherer Werte bei männlichen Patienten unwahrscheinlich erscheint.

Die Auswertung des Kolmogorov-Smirnoff-Tests ergab, dass die Parameter nicht normalverteilt sind, sodass der Mann-Whitney-U-Test angewandt wurde, um zu testen, ob eine Erhöhung der Leberparameter in Abhängigkeit der Blutgruppen auftritt.

Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede der Leberparameter in Abhängigkeit von der Blutgruppe A. Die Transaminasen AST ( $p < 0,001$ ) und ALT ( $p = 0,02$ ),  $\gamma$ -GT ( $p < 0,001$ ) und der APRI-Score ( $p < 0,001$ ) waren bei Patienten mit Blutgruppe A erhöht, während Albumin ( $p < 0,001$ ) erniedrigt war. Außerdem waren die Entzündungsparameter CRP ( $p = 0,01$ ) und IL-6 ( $p < 0,001$ ) bei Blutgruppe A erhöht. Die jeweiligen Streudiagramme mit Loess-Graphen sind den Abbildungen 55-61 zu entnehmen.

Der Median von 56 U/l (Min=13 U/l; Max=15205 U/l) der Blutgruppe A-Patienten liegt deutlich über dem Median von 34 U/l (Min=9 U/l; Max=421 U/l) der Patienten mit Blutgruppe 0, B oder AB. Auffällig sind der bereits initiale (bei Krankenhausaufnahme) vorhandene Peak der Transaminase über dem Normwert bei Blutgruppe A und der steile Abfall ab der dritten Woche. In der sechsten Woche kreuzen sich die beiden Kurven, sodass dann die Blutgruppen A-Werte auf niedrigerem Niveau verbleiben als die Werte bei Patienten mit anderen Blutgruppen.

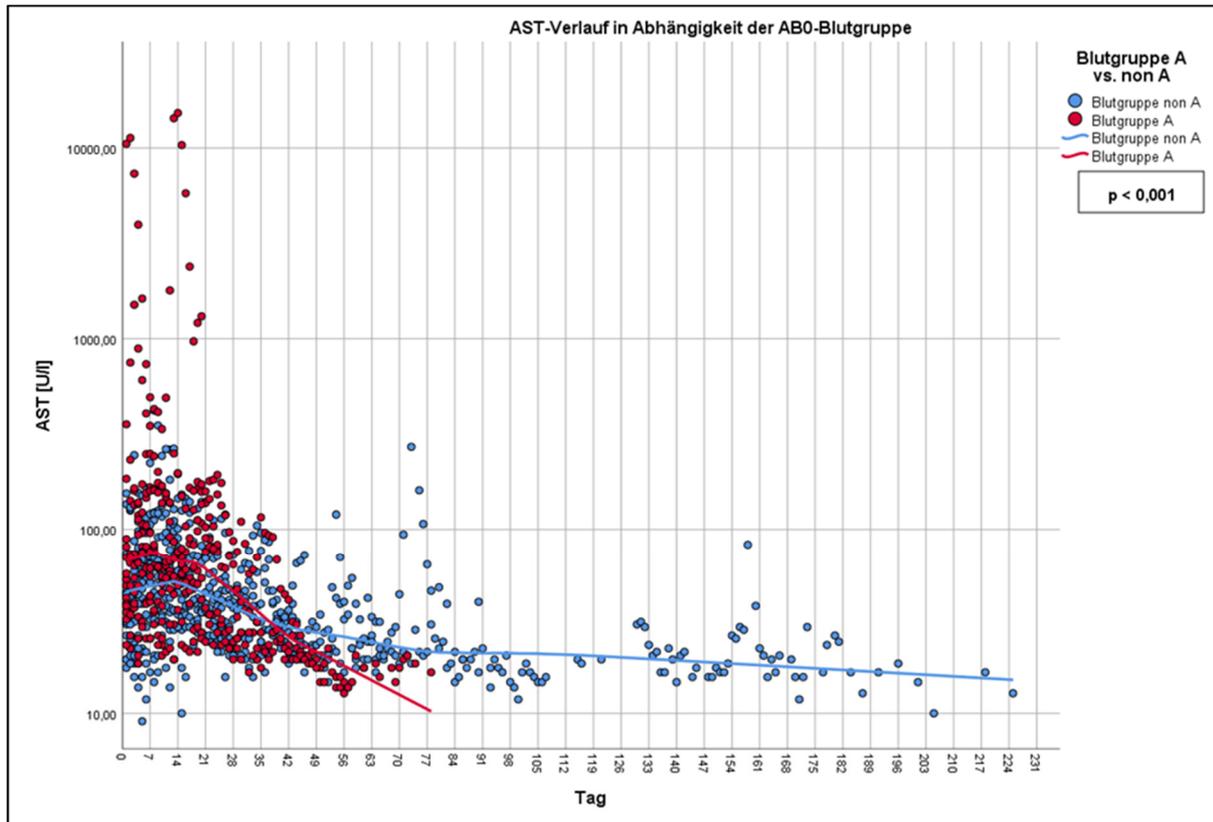


Abbildung 54: AST-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

Abbildung 55 illustriert die Entwicklung der Transaminase ALT. Der Median von 26 U/l (Min=11 U/l; Max=1787 U/l) der Blutgruppe A-Patienten liegt über dem Median von 21 U/l (Min=6 U/l; Max=290 U/l) der Patienten mit Blutgruppe 0, B oder AB. Auch hierbei besteht der Peak zu Beginn bei Krankenhausaufnahme bei Blutgruppe A. Die Kurven kreuzen sich in der fünften Woche, sodass im Kontinuum die Werte der Blutgruppen 0, B und AB höher sind als die der Blutgruppe A-Patienten.

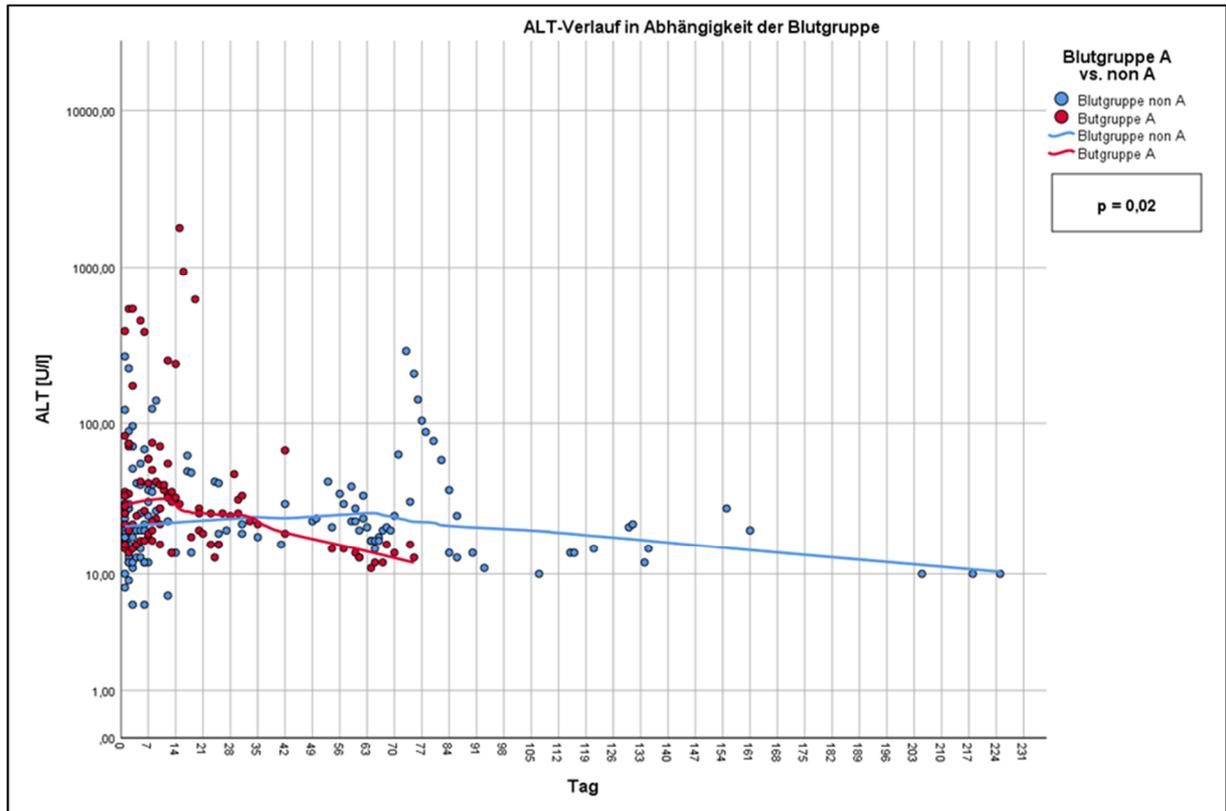


Abbildung 55: ALT-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

Die Unterschiede des APRI-Scores stratifiziert nach Blutgruppen sind in Abbildung 56 dargestellt. Patienten mit Blutgruppe A haben einen Median von 0,5 (Min=0; Max=2004), während bei den Blutgruppen 0, B und AB zusammengenommen der Median mit 0,4 (Min=0; Max=6,8) leicht darunter liegt.

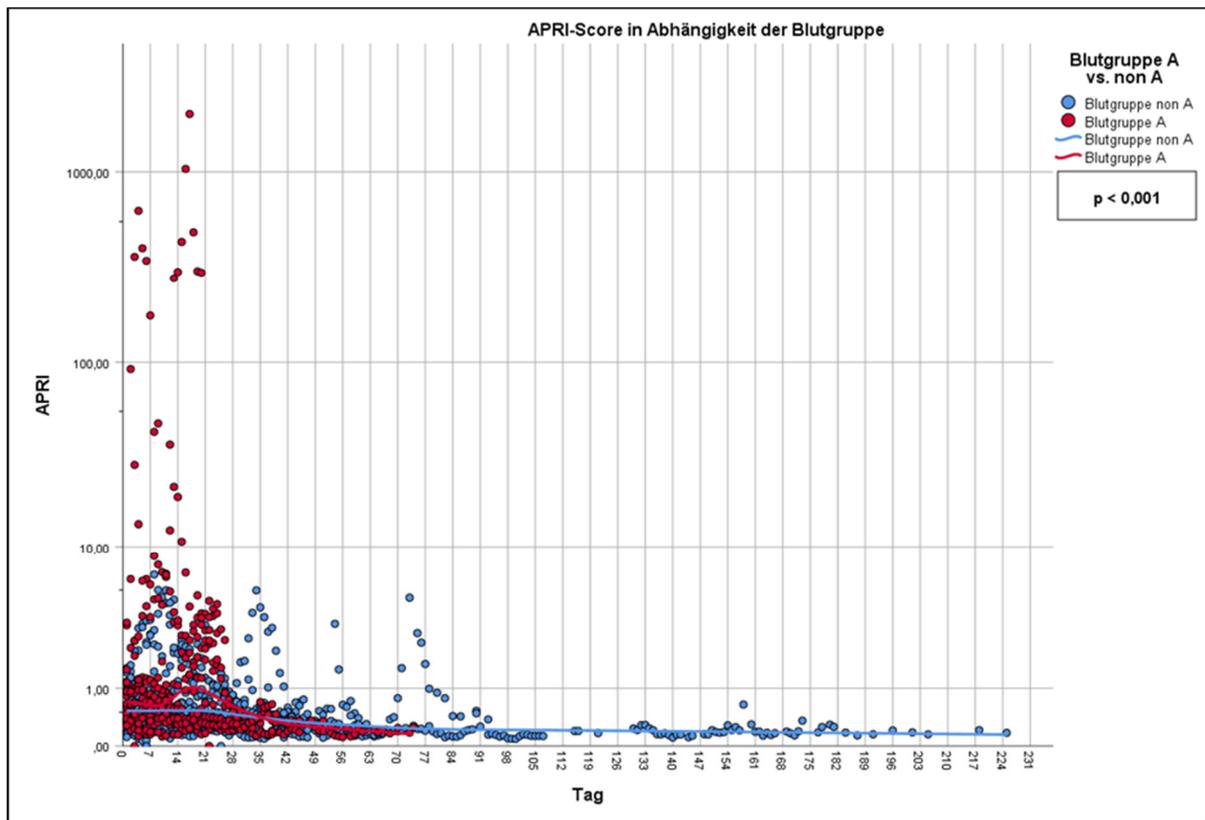


Abbildung 56: APRI-Score in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

Abbildung 57 zeigt die Loess-Graphen der  $\gamma$ -GT-Schwankungen. Mit einem Median von 107 U/l (Min=9 U/l; Max=751 U/l) weisen die Patienten der Blutgruppe A insgesamt höhere Konzentrationen auf als die der anderen Blutgruppen (Mdn=77 U/l; Min= 4 U/l; Max= 904 U/l). Auch hierbei kreuzen sich die beiden Graphen in der fünften Woche, und Patienten mit Blutgruppe A präsentieren einen steileren Abfall auf die physiologische Norm im Gegensatz zu den Blutgruppen 0, B und AB.

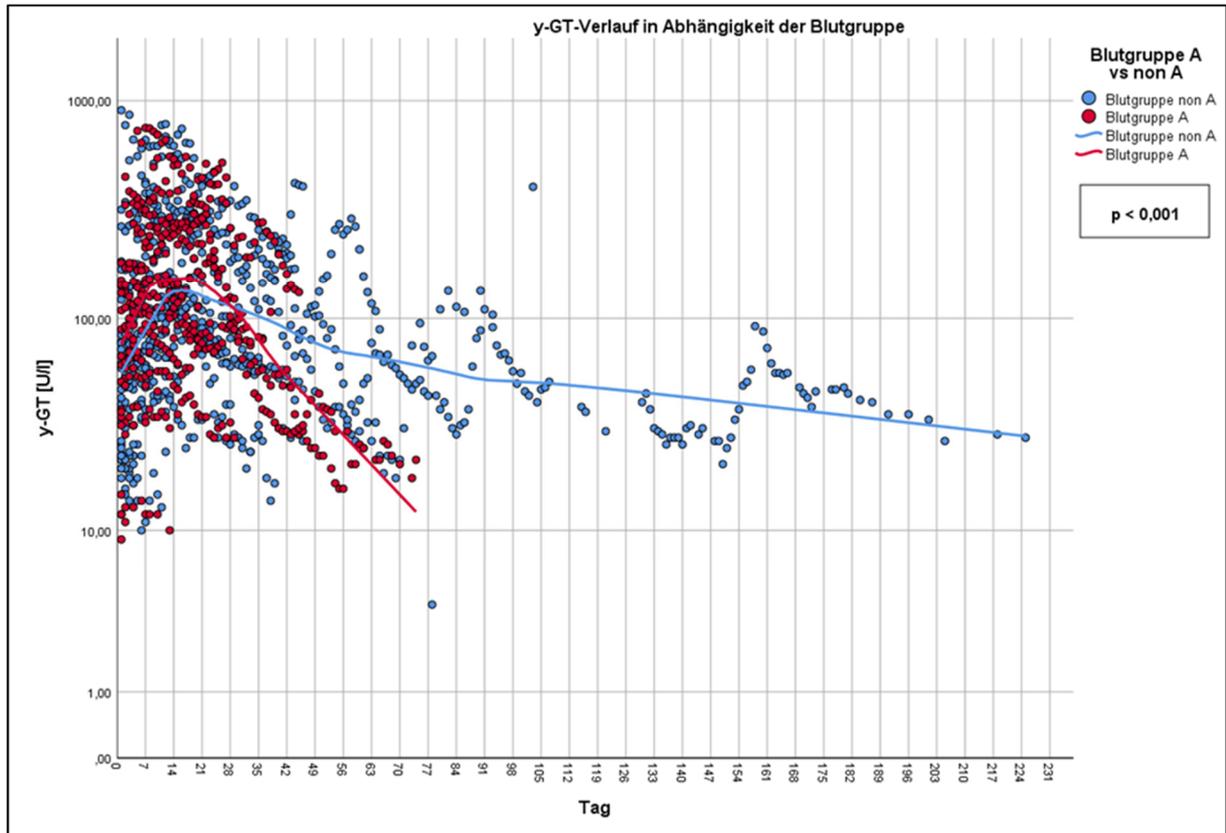


Abbildung 57:  $\gamma$ -GT-Verlauf in Abhängigkeit der ABO-Blutgruppe

Abbildung 58 veranschaulicht die Unterschiede der Konzentrationsveränderungen der Albuminwerte. Der Median des Albuminwerts von 25 g/l (Min=14 g/l; Max=48 g/l) der Blutgruppe A-Patienten liegt unter dem Median von 27 mg/l (Min=16 g/l; Max=45 g/l) der Patienten mit Blutgruppe 0, B oder AB. Verglichen mit dem Verhalten der oben beschriebenen Parameter deutet die Kurve auch bei längerem Krankenhausaufenthalt auf verminderte Syntheseleistung der Leber bei Patienten mit Blutgruppe A hin.

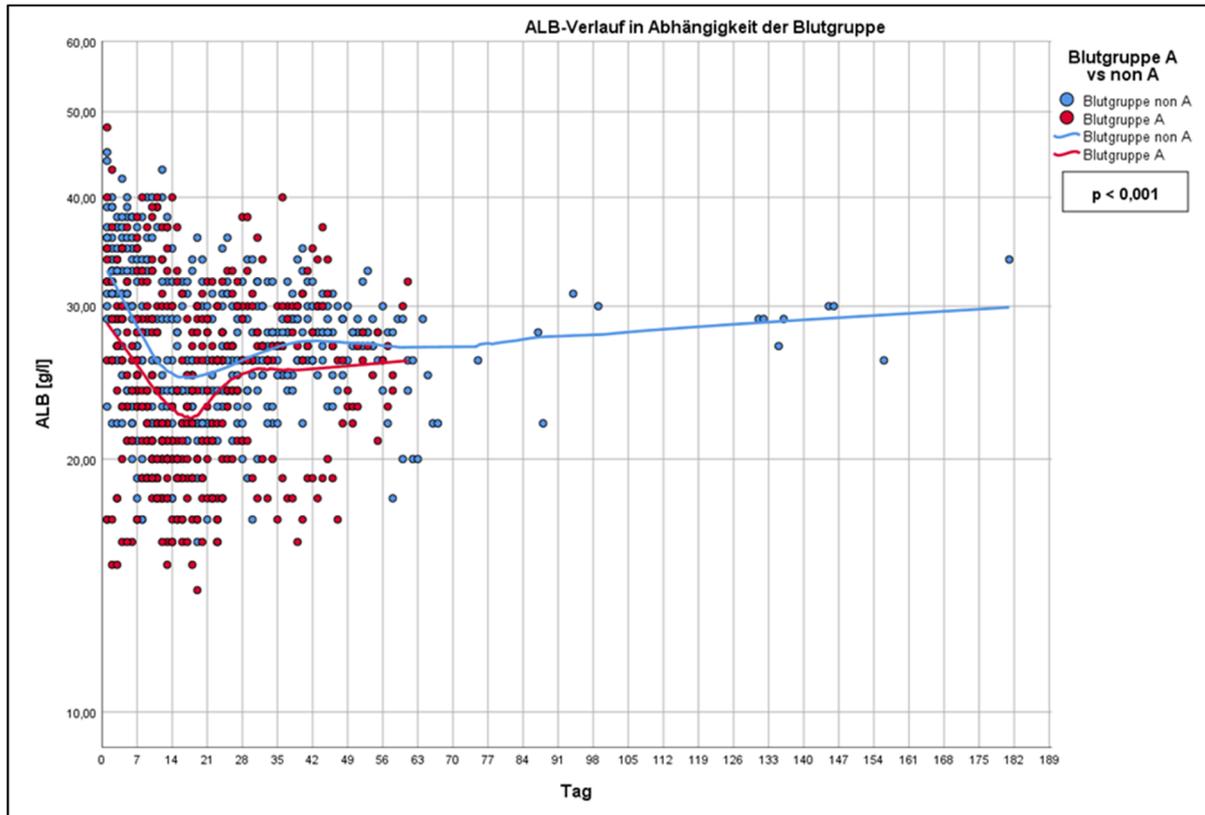


Abbildung 58: Albumin-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

Abbildung 59 illustriert die Entwicklung des Entzündungsmarkers CRP. Der Median von 105 mg/l (Min=0,6 mg/l; Max=522 mg/l) der Blutgruppe A-Patienten liegt über dem Median von 93 mg/l (Min=0,7 mg/l; Max=539 mg/l) der Patienten mit Blutgruppe 0, B oder AB. Der Peak bei Blutgruppe A wird gegen Ende der zweiten Woche erreicht, worauf ein steiler Abfall der Kurve folgt. Beide Kurven kreuzen sich gegen Ende der dritten Woche, sodass im Kontinuum die Werte der Patienten mit den Blutgruppen 0, B und AB höher sind als die der Blutgruppe A-Patienten.

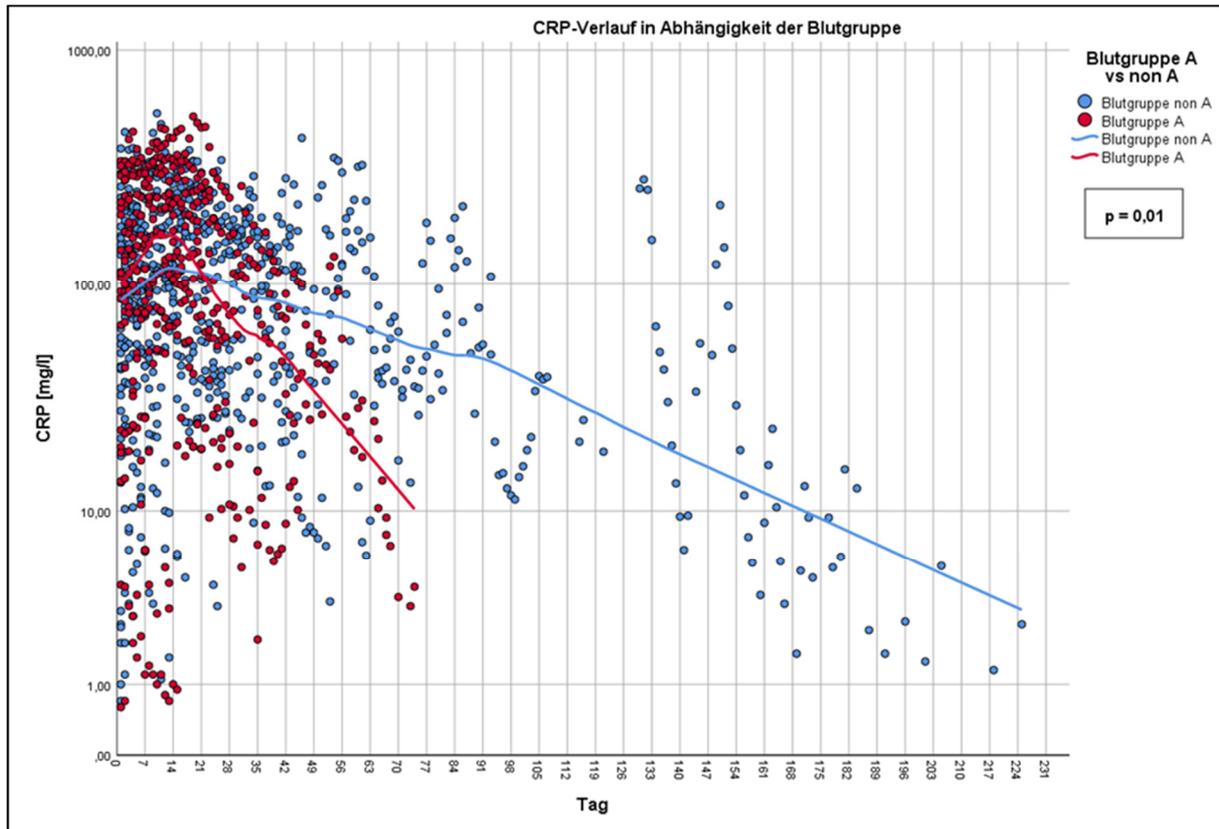


Abbildung 59: CRP-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

Die Loess-Graphen der IL-6-Schwankungen zeigt Abbildung 60. Der Median von 92 pg/ml (Min= 1 pg/ml; Max= 73262 pg/ml) deutet auf eine stärkere Entzündung bei Patienten mit Blutgruppe A als bei Patienten mit anderen Blutgruppen hin (Mdn=58; Min=1; Max= 62070 pg/ml). Eine Umkehr der Tendenz ist ab der fünften Woche zu beobachten, wenn die Konzentrationen bei der Blutgruppe A im Vergleich zu den anderen drei Blutgruppen einen steileren Abfall in den Normalbereich aufweisen.

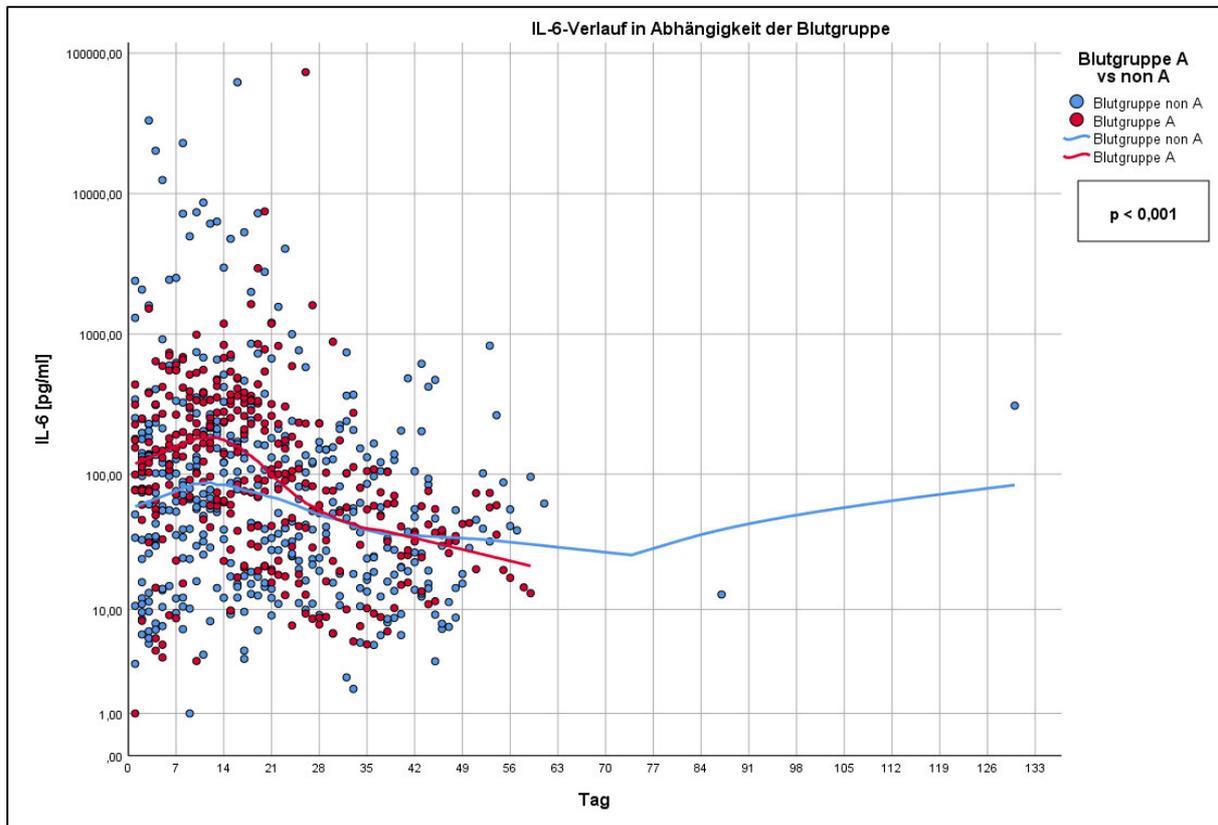


Abbildung 60: IL-6-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe

#### 4.5.3 Korrelation zwischen Blutgruppen und Outcome

Es konnte im Chi-Quadrat-Test kein Zusammenhang zwischen der Blutgruppenzugehörigkeit und einem negativen Outcome oder dem progressiven Krankheitsverlauf der Patienten gezeigt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Leberbeteiligung bei COVID-19

Das Coronavirus SARS-CoV-2 befällt initial den Respirationstrakt und führt bei einer Minderheit infizierter Personen zur Entwicklung eines ARDS, das die Hauptursache des Versterbens von COVID-19-Patienten darstellt. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt während der Pandemie wurde zusätzlich von multiplen extrapulmonalen Manifestationsorten berichtet, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine systemische Infektion handelt. Die Kombination aus Organschäden der Lunge, des Herzens, der Nieren, der Leber und des ZNS, bedingt durch eine systemische Hyperinflammation mit septischem Schock, erschwert die spezifische Behandlung [68].

Diese Studie konzentrierte sich auf eine Analyse der Hepatopathie und gibt Hinweise auf eine genetische Komponente unter den Risikofaktoren. Von 61 Patienten zeigten 72% bei Aufnahme und sogar 85% im Gesamtverlauf ihres jeweiligen Krankenhausaufenthaltes mindestens einen pathologischen Leberparameter (AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT, TBIL, ALB). Obwohl die singulären Aufnahmewerte oder die Maximalwerte Gegenstand von zahlreichen Studien waren, gibt es wenige, die ihren Blick auf das kumulative Laborbild aller Leberparameter mit ihren täglichen Schwankungen lenken. Bloom et al. [17] berichteten beispielsweise von 60 Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion am Massachusetts General Hospital, von denen 69% erhöhte Serumaktivitäten von mindestens einer Transaminase bei Aufnahme aufwiesen. 93% der Patienten entwickelten im Verlauf erhöhte Transaminasen, was ein stärkerer Anstieg als bei dieser Kohorte ist und ebenfalls den Trend zu einer häufigeren Leberbeteiligung während eines Krankenhausaufenthaltes unterstreicht. Erwähnt werden sollte hierbei die Schwierigkeit des Vergleichs der Definition Leberwerterhöhung, da es unterschiedliche Grenzwerte gibt. So waren die Grenzwerte für die Transaminasen in der Studie von Bloom et al. [17] niedriger als die Grenzwerte, nach denen sich diese Studie richtete.

Bei einzelner Betrachtung der Parameter kann ein bestimmtes Muster festgestellt werden, was einigen vorangegangenen Studien entspricht oder auch widerspricht. Ähnlich wie Lei et al. [68] Loess-Regressionen benutzten, um den zeitlichen Verlauf von vier Leberparametern (AST, ALT, AP, TBIL) darzustellen, wurde auch in dieser Studie diese Art der Kurvenglättung gewählt. Die graphische Darstellung wurde allerdings erweitert, indem die Graphen in Kombination mit dem jeweiligen Streudiagramm erstellt wurden, um die Punkte farblich den Patienten zuzuordnen und das Ausmaß der Streuung darstellen zu können. Außerdem sind alle Leberwerte und zusätzlich die systemischen Entzündungsmarker CRP, LDH und IL-6 in die Analyse eingeflossen, die es erlaubten, differenzialdiagnostische Hypothesen zu testen.

- Transaminasen

Die Serumkonzentrationen der Transaminase AST steigen innerhalb der ersten zwei Wochen über den Grenzwert von 50 U/l an und normalisieren sich langsam innerhalb der folgenden Wochen. Die ALT-Werte hingegen erhöhen sich nicht und beschreiben einen beinahe konstanten Verlauf zwischen 20 und 30 U/l. Dies entspricht den häufigen Beobachtungen, dass die AST stärkere und frühere Konzentrationssteigerungen aufweist und somit nicht dem Laborbild einer Virushepatitis entspricht, bei der die Steigerungen der ALT-Werte dominanter sind als die der AST [82]. Andererseits wurde ein zweizeitiges Muster der Transaminasenerhöhung von Lei et al. [68] bei 5771 Patienten gefunden, bei denen der ALT-Konzentrationsanstieg fünf bis zehn Tage nach der AST-Erhöhung auftrat und auf eine Hepatopathie aufgrund der systemischen Inflammation und langsamen Aggravierung von COVID-19 schließen lässt. Kritisch anzumerken ist hier, dass bei dieser Kohorte nur wenige ALT-Werte erfasst werden konnten, da die ALT-Bestimmung nicht routinemäßig erfolgte. Anhand des Spearman-Rangkorrelationstests konnte trotzdem eine positive Korrelation zwischen AST und ALT festgestellt werden, die belegt, dass erhöhte AST-Werte mit erhöhten ALT-Werten einhergehen.

Differenzialdiagnostisch wurde zusätzlich der De-Ritis-Quotient bestimmt und im zeitlichen Verlauf aufgetragen, der mit einem annähernd konstanten Wert  $> 1$  für einen schweren Leberzellschaden spricht. 75% der Patienten hatten einen De-Ritis-Quotienten  $> 1$ , und der Median aller Werte im Gesamtverlauf betrug 1,3. Dies entspricht exakt dem medianen De-Ritis-Quotienten von 1,33 der 105 italienischen Patienten, die in die Studie von Zinellu et al. [137] aufgenommen worden sind. Zinellu et al. [137] konnten außerdem zeigen, dass ein erhöhter De-Ritis-Quotient bei Aufnahme mit einer höheren Mortalität assoziiert ist, im Gegensatz zu isoliert erhöhten Werten von AST oder ALT. Eine AST/ALT-Ratio von  $< 1$  ist typisch für eine akute und chronische virale Hepatitis, was ein weiterer Grund für die Annahme ist, dass SARS-CoV-2 kein „neues“ Hepatitisvirus ist. Es kann durchaus auch bei viraler Infektion zu einer AST/ALT-Ratio  $> 1$  kommen, die möglicherweise auf eine bereits stattfindende Fibrosierung der Leber hinweist [18].

Extrahepatische Erkrankungen, die zu einer starken Zellschädigung führen, können allerdings ebenfalls einen erhöhten De-Ritis-Quotienten  $> 1$  verursachen, weil die Transaminasen nicht leberspezifisch sind und vor allem die AST eine höhere Aktivität in Herzmuskelzellen als in Hepatozyten aufweist [18]. Ebenso ist sie in Zellen der Skelettmuskeln, der Nieren, der Lungen, in Erythrozyten und Leukozyten vorhanden, sodass es bei Herz- und Skelettmuskelerkrankungen zu einem starken Konzentrationsanstieg im Serum kommen kann [6]. So wurde von Li et al. [70] berichtet, dass eine echokardiographisch nachgewiesene Rechtsherzbelastung mit erhöhter Mortalität einhergeht. Aufgrund des ARDS mit erhöhtem pulmonalen vaskulären Widerstand erhöht sich die rechtsventrikuläre Nachlast. Nach kardiorespiratorischem Arrest während eines Schockzustands kann es zu einer hypoxischen Hepatitis kommen, bei der definitionsgemäß die Transaminasen auf das fünffache des ULN ansteigen. Weder in dieser Kohorte noch in anderen in der Literatur beschriebenen Patientengruppen erfüllte ein Großteil der Infizierten die

Kriterien einer hypoxischen Hepatitis, sodass dieser Grund für eine Transaminasenerhöhung einen Ausnahmefall darstellen soll [82].

- Nicht-invasive-Scores

Um die Ursachensuche der Leberwerterhöhung weiter einzugrenzen, wurden zusätzlich zwei nicht-invasive Fibrose-Scores (APRI und FIB-4-Score) berechnet. Während die Scores im zeitlichen Verlauf aufgrund der Glättung des Loess-Graphen nicht den Cut-off-Wert überschritten, so korrelieren die sonst für eine Fibrose oder Zirrhose sprechenden Werte signifikant mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung und dem Versterben der Patienten. Diese Ergebnisse unterstreichen die von Ji et al. [58] aufgestellte Theorie, dass Patienten mit NAFLD ein höheres Risiko für das Entwickeln eines respiratorischen Versagens und somit für einen gravierenden Krankheitsverlauf haben.

Wai et al. [122] etablierten 2003 diesen nicht-invasiven Fibrose-Index und mit ihm zwei unterschiedliche Cut-off-Werte für Fibrose ( $>1,5$ ) und Zirrhose ( $>2,0$ ). Mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 47% kann bei Werten von  $< 0,5$  eine schwere Leberschädigung ausgeschlossen werden. Mit steigendem Cut-off-Wert wird eine Fibrose wahrscheinlicher, sodass ein Wert von  $> 1,5$  mit einer Sensitivität von 41% und Spezifität von 95% auf eine Fibrose hinweist. Deutlich wird hierbei der *Trade-Off* für die von dem von Wai et al. [122] definierten Cut-off-Wert abhängigen Testgütekriterien: Eine hohe Sensitivität geht mit niedriger Spezifität einher und vice versa. Für den ermittelten Median von 0,4 greift daher eine hohe Sensitivität auf Kosten einer niedrigen Spezifität. Der negative prädiktive Wert für den Fibrose-Cut-off von  $< 0,5$  ist 86%, sodass die Mehrheit der Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Leberfibrose entwickelten. Ob der Score jedoch mit derselben Testgüte für Patienten mit COVID-19 angewandt werden kann, erfordert größere Validierungsstudien, da der Score nur für die Verwendung bei Patienten mit einer Hepatitis C Virus-Infektion validiert wurde [122]. Außerdem wurde er verglichen mit anderen histologischen und nichtinvasiven Methoden bei Patienten mit Hepatitis B, einer Autoimmunhepatitis sowie toxischer Hepatitis und NAFLD [48]. Im Gegensatz zu Li et al. [69], die in ihrer Kohorte keine Korrelation zwischen einem erhöhten APRI und dem Versterben fanden, zeigt Abbildung 27 in unserer Studie das deutlich erhöhte Mortalitätsrisiko der Patienten, die einen erhöhten APRI-Score haben.

Kombinieren lässt sich der APRI mit dem FIB-4-Score, welcher 2005 von Sterling et al. [110] entwickelt wurde. Der Cut-off von  $< 1,45$  deutet mit einer Sensitivität von 70% auf die Abwesenheit einer Leberfibrose hin, während Werte  $> 3,25$  mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Fibrose hinweisen (Spezifität 97%). In der COVID-19-Kohorte beträgt der Median 1,7 mit einer großen Streubreite von 0,3-677. Dem Loess-Regressionsgraph zufolge ist der Wert in der ersten Woche nach Hospitalisierung bei 2,0, sinkt auf etwa 1,5 im Laufe von sechs Wochen ab und steigt wieder auf 2,0 bei den Patienten, die über 70 Tage stationiert waren. Damit steigt der Wert nie über den Cut-off von 3,25, sodass eine Leberfibrose

mit einem negativen prädiktiven Wert von 83% unwahrscheinlich ist. Jedoch kann auch hier angewendet werden, dass bis dato noch nicht eruiert worden ist, ob der Score auf Patienten mit COVID-19 anwendbar ist, da er ursprünglich für Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion sowie mit MAFLD validiert wurde [69]. Ungeachtet dessen wurde der FIB-4-Score ebenfalls von Li et al. [69] angewendet, deren Beobachtung kongruent zu unserer ist, wobei der Median der 22 verstorbenen Patienten mit 3,98 jedoch deutlich unter dem Median der 14 verstorbenen Patienten am UKS mit 9,9 liegt. Li et al. [69] bereicherten ihre Analyse interessanterweise mit dem zeitlichen Aspekt: Der FIB-4-Wert stieg bei Verstorbenen als auch bei den Überlebenden initial stark an, normalisierte sich jedoch nur bei den Überlebenden. Anhand des Loess-Graphen kann abgelesen werden, dass sich auch bei den hiesigen Patienten der Score im Verlauf normalisiert und im Gegensatz dazu bei den Patienten mit längerem stationärem Aufenthalt wieder ansteigt.

- Cholestaseparameter

Während die AST nach 14 Tagen im Loess-Graphen ihren Peak erreichte, konnte ein steiler Anstieg der Cholestaseparameter AP und  $\gamma$ -GT bis zu ihrem Peak über dem Normwert nach 21 Tagen beobachtet werden. Respektive Metaanalysen beschreiben Konzentrationsanstiege der AP bei 6%, der  $\gamma$ -GT bei 21% und des Bilirubins bei 35% der COVID-19-Patienten [nach 70]. In dieser Kohorte liegt der Anteil der Patienten mit abnormen Cholestaseparametern deutlich darüber: 45% präsentierten AP-Aktivitäten über der Norm und 70%  $\gamma$ -GT-Werte über dem ULN. Vergleichbar hingegen fällt mit 34% der Anteil der erhöhten Bilirubinwerte aus. Auffällig ist das biphasische Muster: initialer Transaminasenanstieg gefolgt von Zeichen einer Cholestase. Histopathologische Untersuchungen von Leberbiopsaten verstorbener COVID-19-Patienten zeigten eine Proliferation der Gallengänge, portale Inflammation sowie lobuläre und duktales Cholestase [67]. Eine mögliche Ursache dafür könnten Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 sein, die, von Kupffer-Zellen synthetisiert, im Rahmen des Zytokinsturmsyndroms während einer fulminanten SARS-CoV-2-Infektion häufig in stark erhöhten Konzentrationen gemessen wurden [77]. So wurde auch in dieser Kohorte eine unverkennbar erhöhte IL-6-Konzentration während des gesamten Krankenhausaufenthaltes bei einem Großteil der Patienten dokumentiert. Nicht nur IL-6 als Entzündungsmarker, sondern auch CRP und LDH korrelieren positiv mit dem Cholestaseparameter  $\gamma$ -GT. Geier et al. [40] berichteten, dass proinflammatorische Zytokine, darunter IL-6, eine hepatozelluläre Cholestase auslösen könnten, indem sie hepatozelluläre und cholangiozelluläre Transportmechanismen inhibieren. Sie reduzieren die duktales Gallensekretion und beeinträchtigen die Barrierefunktionen der Gallengangepithelzellen. IL-6 wiederum ist ein potenter Mediator, der bei aktiver duktozellulärer Proliferation induziert wird und eine Cholangitis aufrechterhalten kann.

Unsere klinischen Ergebnisse spiegeln zum Teil die von Schattenberg et al. [102] wider, die unter 44 Patienten einen dominanteren Anstieg der AST als der ALT und ebenfalls auffällig hohe APRI- und FIB-4-Scores beobachteten. Selten erhöht waren hingegen die Cholestaseparameter, und ob diese mit

einem negativen Outcome der Patienten zusammenhängen, wurde nicht weiter untersucht. Einen interessanten neuen Ansatz brachten Anastasiou et al. [5], die bei 147 Patienten am Universitätsklinikum Essen ein Muster zwischen Leberschädigung und des Virusnachweises mittels PCR zeichneten. Die maximale Leberschädigung wurde zu einem Zeitpunkt beobachtet, als das Virus nicht mehr im Atemtrakt nachweisbar war [5].

- Syntheseleistung

Der Syntheseparameter Albumin wird erwartungsgemäß bei Patienten mit COVID-19 in geringerem Ausmaß synthetisiert. Die Konzentrationen sinken nach stationärer Aufnahme rasch ab, erreichen nach etwa 15 Tagen ihren Tiefpunkt und steigen im weiteren Verlauf wieder an. Der physiologische Normwert von 35 g/l wurde jedoch nie erreicht, und der Median von 26 g/l liegt unter dem niedrigsten Grenzwert von 28 g/l der Child-Pugh-Klassifikation. Die INR hingegen, als Parameter zur Überprüfung der in der Leber synthetisierten Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, ist im Gesamtverlauf im Normbereich. Lediglich Ausreißer zeigen stark erhöhte Werte innerhalb der ersten zwei Wochen nach Aufnahme, was darauf hinweist, dass die Gerinnungsfunktion und somit die Synthesefunktion der Hepatozyten bei den meisten Patienten nicht stark eingeschränkt sind oder bei kritisch kranken Patienten ausreichend substituiert wurde. Ähnliches wird von Mishra et al. [79] angenommen, die gezeigt haben, dass eine Hepatopathie nicht mit einer verlängerten Prothrombinzeit in Zusammenhang steht. Albumin wird zu den negativen Akute-Phase-Proteinen gezählt, und die Serumkonzentrationen sinken bei akuten Entzündungen. Dafür verantwortlich ist wiederum IL-6, was einerseits die Synthese von Akute-Phase-Proteinen stimuliert, andererseits die Synthese von Albumin inhibiert [130]. Daher kann die Hypoalbuminämie, die im gesamten Infektionszeitraum mit den IL-6-Spiegeln negativ korreliert, als Zeichen der durch SARS-CoV-2 ausgelösten Entzündungsreaktion und andauernden Zytokin-Wirkung angesehen werden [82].

Zusammenfassend erreichen die Loess-Graphen der jeweiligen Parameter ihr Maximum nach zwei bis drei Wochen. Vergleichbar sind die Phasen der Leberparameter mit denen der systemischen Entzündungsmarker CRP, LDH und IL-6, die ebenfalls in den ersten 14 Tagen nach Aufnahme ansteigen und danach unterschiedlich schnell, aber stetig, sinken. Alle Entzündungsmarker zeigen einen signifikant positiven Rangkorrelationskoeffizienten mit den Serumaktivitäten der AST und  $\gamma$ -GT und einen negativen Koeffizienten mit Albumin. Bewusst wurden die drei Parameter ausgewählt, um auf die Art der Leberschädigung schließen zu können. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Leberparameter eher als Surrogatmarker einer generalisierten Infektion angesehen werden können. Kongruent ist die Zeitspanne von zwei bis drei Wochen mit dem Zeitraum bis zur Entwicklung eines akuten Leberversagens [68]. Gemessen an 5771 Patienten in der Studie von Lei et al. [68] wurde in einem Zeitstrahl aufgetragen, wie lang es im Median dauerte, bis Patienten ein ARDS, ein akutes Nierenversagen, ein akutes Leberversagen oder einen septischen Schock erlitten. Mit einer Prävalenz von 6% entwickelte sich ein akutes Leberversagen am medianen Tag 17. Interessanterweise betrug die Spannbreite 13 bis 23 Tage, was der

Dauer bis zu den Maxima unserer Parameterkurven entspricht. Der zeitliche Aspekt ist nicht vollständig vergleichbar, da Lei et al. [68] die Dauer von Symptombeginn an berechnet haben, während in dieser Studie die stationäre Aufnahme als „Tag 0“ angesehen wird und einige Patienten bereits zuvor im häuslichen Umfeld oder in anderen Krankenhäusern symptomatisch waren. Der Zeitraum von ca. 13 Tagen entspricht ungeachtet dessen auch der Aggravierung hin zum kritischen Krankheitsstadium, wie von Berlin et al. [13] illustriert.

Obwohl eine Hepatopathie in einigen Studien als mild beschrieben wird und keinen negativen Einfluss auf das Outcome der COVID-19-Patienten hat, berichteten andere, dass Patienten mit pathologisch veränderten Leberwerten bei Aufnahme ein höheres Risiko eines kritischen Verlaufs von COVID-19 haben [20,96]. In dieser Studie wurden alle erhöhten Leberparameter (außer der ALT) und die erniedrigten Werte bei Albumin mit einem negativen Outcome bei COVID-19-Erkrankung in Zusammenhang gebracht: Entwicklung einer Pneumonie, Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie, Beatmungspflichtigkeit, ECMO-Therapie und Versterben korrelieren signifikant mit pathologischen Leberwerten. Kaplan-Meier-Kurven, wie sie zum Beispiel von Meszaros et al. [78] erstellt wurden, zeigen die Relevanz der Leberparameter als Prognosemarker. Patienten mit abnormen Parametern bei Aufnahme hatten in der genannten Studie eine höhere Wahrscheinlichkeit, im Krankenhaus zu versterben, als Patienten mit einer normalen Leberfunktion.

Neu ist dagegen die Art der Kaplan-Meier-Analyse in dieser Studie, weil sie hier nicht die kumulative Häufigkeit des Versterbens, sondern die Häufigkeit des Überschreitens des ULN der jeweiligen Leberparameter während des gesamten Krankenhausaufenthaltes illustriert. Mithilfe des Log-Rank-Tests wurde geprüft, ob sich die zeitliche Entwicklung der Serumwerte nach Outcome unterschied und nicht nur der singuläre Wert am Aufnahmetag beobachtet. Signifikant ist, dass beatmungspflichtige Patienten häufiger und früher eine AST-Aktivität höher als das Zweifache des ULN sowie eine  $\gamma$ -GT-Aktivität höher als ULN aufwiesen. Darüber hinaus ist ebenfalls signifikant, dass verstorbene Patienten häufiger AST-Werte über dem zweifachen ULN präsentierten und dies wieder in dem Zeitraum der ersten beiden Wochen nach Hospitalisierung: Alle Verstorbenen wiesen bereits in den ersten zwei Wochen AST-Werte über dem definierten Grenzwert auf oder erlagen bereits zuvor den Folgen von COVID-19. Basierend auf den Ergebnissen sollte angedacht werden, bei stationierten COVID-19-Patienten AST und  $\gamma$ -GT bei Aufnahme als Prognosemarker und im Verlauf regelmäßig als Überwachungsparameter zu bestimmen.

## 5.2 Risikofaktoren einer Hepatopathie während COVID-19

Das durchschnittliche Alter dieser Kohorte lag bei 63 Jahren und ist somit minimal höher als das Alter von 60 Jahren, das derzeit von der WHO als Risikofaktor gelistet ist [141]. In dieser Patientengruppe haben Patienten über 65 Jahre eine höhere Letalität (39%) als Patienten jünger als 65 Jahre (11%). Dies ist unabhängig von der Leberfunktion. Signifikant schlechter sind allerdings die Leberparameter bei

Männern, was beispielsweise von Mishra et al. [79] bestätigt wurde. Unter 366 amerikanischen COVID-19 Patienten mit annähernd gleicher Geschlechterverteilung (50,3% männlich, 49,7% weiblich) war der Anteil der männlichen Patienten, die eine Hepatopathie erlitten, signifikant größer als der der weiblichen. Neben dem Alter und dem Geschlecht sind etablierte Risikofaktoren ein höherer BMI, Hypertonie, Diabetes mellitus und kardio-pulmonale Vorerkrankungen [141].

Um die Auswirkungen der Allelvarianten und des Blutgruppenstatus nicht durch die Risikofaktoren zu verfälschen, wurde mit einer Kontrollkohorte von Blutspendern, bei denen Vorerkrankungen ausgeschlossen werden konnten, ein Case-Control-Matching durchgeführt. Das durchschnittliche Alter ist mit 63 Jahren dasselbe und somit gut vergleichbar. Hingegen war problematisch, dass sich die Spannweite der Kohorte zwischen 60 und 70 Jahren bewegt und daher wesentlich kleiner ist als die Spannweite zwischen 19 und 91 Jahren in unserer COVID-19-Kohorte. Außerdem war der Anteil der Frauen größer als der der Männer, sodass beim kombinierten Case-Control-Matching die statistische Analyse mit nur wenigen Patienten möglich war. Aufgrund fehlender Daten war außerdem kein Matching für Charakteristika wie BMI, Hypertonie, Diabetes mellitus und kardio-pulmonale oder Lebererkrankungen möglich.

### 5.2.1 Vitamin D-Status

Ein Mangel an Vitamin D ist definiert mit einem Wert unter 20 ng/ml 25(OH)-Vitamin D [54,55]. 82% der COVID-19 Patienten wiesen bei Aufnahme einen Vitamin D-Mangel auf und sogar 55% einen 25(OH)-Vitamin D-Wert unter 12 ng/ml. Dies ist der vom Robert-Koch-Institut definierte Grundwert für eine mangelhafte Versorgung, die zusätzlich mit einem erhöhten Risiko für Krankheiten wie Osteomalazie und Osteoporose einhergeht [97]. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass nur bei etwas mehr als der Hälfte der Patienten der Vitamin D-Wert erfasst werden konnte, d.h. bei nur etwas mehr der Hälfte der Patienten dieser Kohorte. Dieser Anteil liegt deutlich über der Häufigkeit von 15% der Erwachsenen, die nach Angaben des Robert-Koch-Instituts unter einem risikobehafteten Vitamin D-Mangel in Deutschland leiden [97]. Signifikant waren mehr Patienten mit einem Vitamin D-Mangel auf der Intensivstation und präsentierten sich mit höheren  $\gamma$ -GT und CRP-Werten. Aufgrund der Rolle der Leber im Vitamin D-Metabolismus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sich Leberwerte in Anwesenheit der genetischen Risikofaktoren verschlechtern, was wiederum eine negative Auswirkung auf den Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion haben könnte.

Hastie et al. [49] konnte keine Assoziation zwischen den Vitamin D-Konzentrationen im Serum und dem Risiko einer SARS-CoV-2-Infektion nachweisen. Zu diesem Ergebnis sind sie nach Auswertung der Daten von 449 Patienten gekommen, deren Labordaten in der UK-Biobank gespeichert sind. Die Auswertung einer Metaanalyse mit insgesamt 8176 COVID-19-Patienten von Pereira et al. [83] kam allerdings zu dem Ergebnis, dass ein Vitamin D-Mangel ( $< 20$  ng/ml 25(OH)-Vitamin D) zwar nicht das Risiko einer Infektion, aber den Schweregrad von COVID-19 besonders bei Menschen, die älter als 65

Jahre sind, erhöht. Sie berichteten zudem, dass Vitamin D – ebenso wie in unserer Studie - invers mit den Entzündungsmarkern CRP und IL-6 korreliert.

Mögliche Ursachen und Risikofaktoren für einen niedrigen Vitamin D-Status sind erhöhtes Alter, erhöhter BMI, Fehlernährung und vor allem mangelnde Sonnenlichtexposition [76]. Insbesondere in den Wintermonaten zwischen Oktober und März ist in den Breitengraden Deutschlands keine UV-B-strahlungsabhängige Eigensynthese möglich. Diese Faktoren, die mit einer herabgesetzten Funktion des Immunsystems einhergehen, zählen ebenfalls zu den Risikofaktoren einer Infektion mit SARS-CoV-2. Viele der im März und April hospitalisierten Patienten könnten daher aufgrund von Immobilisation begründet durch hohes Alter oder langen COVID-19-Verlauf zuvor im häuslichen Umfeld einen Vitamin D-Mangel erworben haben.

Neben der phänotypischen Ausprägung wurden sechs Risikovarianten des Vitamin D-Metabolismus (*GC*, *DHCR7*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *AMDHDI*, *SEC23A*) bestimmt. Dieser Zusammenhang wurde bis dato noch nicht getestet. Nach Untersuchung auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht fanden sich jedoch keine Unterschiede in der Allelfrequenzverteilung zwischen der Kontrollgruppe und der COVID-19-Gruppe, möglicherweise aufgrund der relativ kleinen Patientenzahl. Innerhalb der Kontrollgruppe lagen jedoch zwei Abweichungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts vor, die als ein Hinweis für möglicherweise protektive Varianten verstanden werden könnten. Für den SNP rs8018720 des *SEC23A*-Gens und den SNP rs10745742 des *AMDHDI*-Gens liegt jeweils ein Homozygotenexzess des Minorallels vor. Interessanterweise ist jedoch nach Angaben von Jiang et al. [59] jeweils das Majorallel für eine Senkung der Vitamin D-Konzentration verantwortlich, sodass die Präsenz eines homozygoten Minorallels protektiv wirken und den Vitamin D-Status verbessern könnte. Das ist eine mögliche Erklärung der Abweichung zugunsten der Minorallele, weil in der Kontrollgruppe drastische Erkrankungen ausgeschlossen worden waren.

### 5.2.2 Präsenz von Allelvarianten

Personen mit MAFLD sind dem Risiko einer gravierenden COVID-19-Erkrankung ausgesetzt [136]. Die Allelvarianten der Gene *PNPLA3*, *TM6SF2* und *MBOAT7* sind bekannte Risikofaktoren für die MAFLD und konnten außerdem von Krawczyk et al. [65] mit einer Modulation von Steatose und Fibrose bei MAFLD-Patienten assoziiert werden. Anhand der Analyse der Verlaufskurven von Lebertests bei hospitalisierten Patienten mit COVID-19 wird hier gezeigt, dass die MAFLD-prädisponierende *MBOAT7*-Variante auch mit einer Verschlechterung der Leberfunktion während einer SARS-CoV2-Infektion in Verbindung gebracht werden könnte. Eine signifikante Korrelation zwischen abnormen Werten der Leberparameter bei Aufnahme und dem *MBOAT7*-Polymorphismus wurde festgestellt. COVID-19 ist eine fortschreitende Krankheit, die durch sich dynamisch verändernde klinische Zustände und Labortests gekennzeichnet ist. Daher ist es offensichtlich, dass Analysen von Lebertests, die von einem einzigen Tag stammen, die Chance, genetische Modifikatoren der Leberschädigung zu erfassen, einschränken. Bisher wurden die kumulativen Labordaten aus dem gesamten Krankenhausaufenthalt

nicht mit dem Auftreten eines Risikoallels in Verbindung gebracht. Unsere Analysen zeigten im Vergleich zu Personen mit dem *MBOAT7*-Wildtyp-Genotyp während des Krankenhausaufenthalts signifikant erhöhte ALT-, AP-,  $\gamma$ -GT- und Bilirubinspiegel sowie niedrigere Albuminkonzentrationen. Auf Grundlage der Studie von Valenti et al. [119] sollten unsere Ergebnisse, aufgrund der kleinen Kohortengröße, jedoch eher als ein erster Hinweis angesehen werden. Valenti et al. [119] fanden in ihrer Analyse von 1460 britischen Patienten heraus, dass die Risikogene *PNPLA3*, *TM6SF2* und *MBOAT7* nicht das Risiko eines schweren Verlaufs von COVID-19 erhöhen. Vielmehr schien die Minorallelvariante von *PNPLA3* I148M einen protektiven Effekt zu haben, wie auch Bianco et al. [15] bestätigten.

Kongruent ist die Aussage von Koo et al. [62], welche eine Assoziation mit der *MBOAT7*-Allelvariante zu systemischer Inflammation postulierten. Mit 42 Patienten war die Kohorte dieser Genotypisierung kleiner als die in unserer Untersuchung. Die Aussage der *MBOAT7*-Analysen kann außerdem nicht auf andere Ethnien übertragen werden, da die Studie nur Patienten mit europäischer Herkunft einschloss. Die Minorallelfrequenz ist mit bis zu 44% bei Europäern höher als bei Menschen afrikanischer oder asiatischer Abstammung (33% bzw. 24%) [115].

Im Gegensatz zu Bianco et al. [15], die keine Auswirkung eines Risikoscores für Leberfettgehalt (bestehend aus den Allelvarianten der Gene *PNPLA3*, *TM6SF2*, *MBOAT7* und Glucokinase-Regulator (*GCKR*)) auf COVID-19 fanden, lässt die kombinierte Analyse der Steatose-SNPs dieser Studie eine Wirkung vermuten. Mit größerer Zahl Risikoallele von *PNPLA3*, *TM6SF2* und *MBOAT7* steigen die Konzentrationen der Cholestaseparameter AP,  $\gamma$ -GT sowie der APRI. In dieser Form wurde der Zusammenhang bisher nicht für COVID-19-Patienten dokumentiert und dies ist ein weiterer Hinweis für eine mögliche genetische Ätiologie der Hepatopathie.

Neben den Polymorphismen im Zusammenhang mit einer Steatosis hepatis wurde die Theorie überprüft, ob Menschen mit einem A1AT-Mangel eine höhere Anfälligkeit für eine Infektion mit SARS-CoV-2 haben. A1AT ist ein hauptsächlich in den Hepatozyten synthetisierter Inhibitor von Serinproteasen, u.a. der Protease TMPRSS2, die das Spike-Protein des Coronavirus spaltet und somit aktiviert [34]. Die Arbeitshypothese war, dass bei einem A1AT-Mangel weniger A1AT im Serum vorhanden ist und daher SARS-CoV-2 nicht am Zelleintritt gehindert wird. Die Genotypisierungsergebnisse zeigten jedoch keinen Hinweis auf eine Überrepräsentation der Mutationen, die einen A1AT-Mangel verursachen. Aus diesem Grund wurde die Hypothese verworfen, und es besteht keine Evidenz für eine Therapie aller COVID-19-Patienten mit A1AT.

### 5.2.3 AB0-Blutgruppenstatus

Multiple Studien weisen auf das erhöhte Risiko für Menschen mit Blutgruppe A hin, sich mit SARS-CoV-2 zu infizieren [32,135]. Noch nicht untersucht wurde hingegen, inwiefern der Blutgruppenstatus auch mit dem Grad der Leberschädigung in Verbindung steht. In dieser Kohorte wurde von 58 Patienten

die AB0-Blutgruppe bestimmt, darunter teilweise mittels Sequenzierung. Aufgrund der wenigen Patienten mit Blutgruppe B und AB wurde auf eine ANOVA verzichtet und in allen Analysen Blutgruppe A den Blutgruppen 0, B, und AB gegenübergestellt. Die Ergebnisse weisen auf eine initiale stärkere Leberbeteiligung bei Patienten mit Blutgruppe A hin. Die Transaminasen AST und ALT,  $\gamma$ -GT und APRI sind bei Patienten mit Blutgruppe A signifikant erhöht, während Albumin erniedrigt ist. Außerdem sind die Entzündungsparameter CRP und IL-6 bei Patienten mit Blutgruppe A erhöht. Bei Betrachtung des Gesamtverlaufs fällt allerdings auf, dass die Laborwerte bei Patienten mit den Blutgruppen 0, B oder AB eine stärkere Leberschädigung anzeigen. So fällt beispielsweise der AST-Loess-Graph der Blutgruppe A stärker ab als der Loess-Graph der Blutgruppen 0, B und AB und sinkt in der sechsten Hospitalisationswoche dauerhaft unter diesen. Ähnlich verhält es sich mit den Konzentrationsschwankungen von ALT,  $\gamma$ -GT, CRP und IL-6. Möglicherweise wird eine Hepatopathie nach der primären Akutreaktion durch mit der Blutgruppe A zusammenhängenden Mechanismen auf lange Zeit verbessert. Eine mutmaßliche Rolle der Blutgruppen in der Entwicklung einer Leberschädigung unabhängig von COVID-19 fanden Krawczyk et al. [persönliche Mitteilung]. Bei Patienten mit Blutgruppe 0 quantifizierten sie eine stärkere Leberfibrose mittels Elastographie. Dies entspricht dem möglicherweise protektiven Effekt von mit Blutgruppe A zusammenhängenden Mechanismen im Vergleich zu Blutgruppe 0. Gemessen an der epidemiologischen Verteilung in Deutschland und auch der Kontrollkohorte liegt in der COVID-19-Kohorte eine Überrepräsentation der Blutgruppe 0 vor.

Ellinghaus et al. [32] untersuchten erstmals in ihrer GWAS (engl. *genomewide association study*) eine mögliche Assoziation des Blutgruppenstatus mit einer SARS-CoV-2-Infektion bei 1610 Patienten aus Spanien und Italien. Sie stellen dar, dass Patienten mit Blutgruppe A ein höheres Risiko haben, einen progredienten Verlauf bis zum respiratorischen Versagen zu erleiden, als Patienten mit den Blutgruppen B, 0 oder AB. Die Theorie wurde beispielsweise von Zhao et al. [135] untermauert, die anhand der Blutgruppenverteilung bei 2173 chinesischen Patienten ebenfalls zu dem Ergebnis kamen, dass die Blutgruppe A einen Risikofaktor darstellt und die Blutgruppe 0 hingegen einen Schutz vermittelt. Valenti et al. [120] fügten diesen Erkenntnissen hinzu, dass Blutgruppe A- und AB-Patienten signifikant häufiger einen schweren COVID-19-Verlauf mit intensivmedizinischer Behandlung aufgrund von Beatmungspflichtigkeit erlitten, während Blutgruppe 0-Patienten eine niedrigere Mortalität aufwiesen.

Bianco et al. [15] waren bis dato die Einzigen, die eine Leberwertveränderung mit der Blutgruppe 0 assoziierten. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen hatten Patienten mit Blutgruppe 0 höhere AST-Werte als Patienten mit Blutgruppenantigenen.

Mögliche Gründe für den Einfluss der Blutgruppen sind die Antikörper gegen das jeweils nicht vorhandene Blutgruppenantigen auf Erythrozyten und Epithelzellen. Guillon et al. [47] fanden im Rahmen der SARS-Epidemie heraus, dass anti-A-Antikörper die Adhäsion von Zellen, welche das SARS-CoV-S-Protein exprimieren, an ACE2-exprimierenden Zelllinien hemmten. Angesichts der Ähnlichkeit zu SARS-CoV und der ebenfalls starken Bindungsaffinität zu ACE, könnte die geringere Suszeptibilität

von Patienten mit Blutgruppe 0 einer SARS-CoV-2-Infektion mit den Blutgruppenantikörpern zusammenhängen. Gérard et al. [41] machten darauf aufmerksam, dass das Vorhandensein von anti-A-Antikörpern im Serum und insbesondere von IgG-Anti-A als ein Faktor betrachtet werden sollte, der relevanter ist als die Blutgruppe selbst. In ihrer Studie fanden sie unterschiedliche Infektionsraten bei Patienten mit der Blutgruppe 0 und Blutgruppe B, welche beide zirkulierendes anti-A besitzen. Patienten der Gruppe 0 waren unter den COVID-19 Patienten unterrepräsentiert, während Gruppe B überrepräsentiert war. Dies könnte darauf hinweisen, dass anti-A bei Blutgruppe 0 mehr Schutz bietet als anti-A bei Gruppe B. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der vorherrschende Immunglobulin-Isotyp von anti-B/anti-A im Serum von Personen mit Blutgruppen A und B IgM ist, im Serum der Gruppe 0 jedoch IgG [41].

Die Frage bleibt offen, ob Veränderungen der Membran-Glykane auch zur unterschiedlichen Gewebeempfindlichkeit gegenüber einer SARS-CoV-2-Infektion beitragen. Größere Kohorten sind notwendig, um zu differenzieren, ob Antigene der Blutgruppe A eine stärkere Leberbeteiligung als eine Lungenbeteiligung auslösen, oder ob der Mangel an anti-A-Antikörpern im Serum der ausschlaggebende Faktor ist.

### 5.3 Stärken der Studie

Die vorgelegte Studie gehört zu den ersten drei klinischen COVID-19-Studien in Deutschland mit Fokus auf eine Leberbeteiligung. Im Gegensatz zu den von Schattenberg et al. [102] im Mai und von Anastasiou et al. [5] im August 2020 veröffentlichten Studien besteht die hier untersuchte Kohorte aus den ersten 61 Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes, die sowohl während der ersten Infektionswelle ab März als auch während der zweiten Infektionswelle ab September 2020 erkrankten. Neben der zeitlichen Diversität waren auch die Anamnesen und Entwicklungen der Behandelten sehr heterogen: Altersdifferenz zwischen 19 und 91 Jahren, Krankenhausaufenthaltsdauer zwischen einem und 246 Tagen, Organtransplantationen bei zwei Patienten in der Vorgeschichte (Lunge und Niere), eine gravide Patientin mit erfolgreicher Entbindung während des Aufenthaltes sowie vier Patienten, die von einer ECMO-Therapie profitiert und dank dieser die Infektion überlebt haben. Außerdem wurde bei einem Patienten die Erstdiagnose AIDS gestellt, nachdem dieser neben einer COVID-19-Pneumonie eine *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie entwickelte [73]. Die Studie wurde erst abgeschlossen, als alle Patienten nicht mehr hospitalisiert waren (nach Entlassung oder Versterben). Darüber hinaus ist der Gebrauch der Kaplan-Meier-Analysen für Laborparameter und der Einsatz der Loess-Graphen zum Vergleich zweier Kategorien (Genotyp, AB0-Blutgruppe) ein neuer Ansatz, der bisher nicht in anderen COVID-19-Studien zu finden ist. Einmalig ist außerdem der bis dato nicht dokumentierte Zusammenhang zwischen Blutgruppe A und der Konzentrationsänderung der Surrogatmarker für Leberschädigung

und systemische Entzündung (AST, ALT,  $\gamma$ -GT, Albumin, APRI, CRP, IL-6). Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Assoziation des Polymorphismus des *MBOAT7*-Gens mit den Veränderungen von ALT, AP,  $\gamma$ -GT, Bilirubin und Albumin.

Eingeordnet in aktuelle Studien zu COVID-19 liefert die Analyse der Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes einen Beitrag zu Risikofaktoren für eine Hepatopathie bei COVID-19 und gibt als eine der ersten Studien eine multiparametrische Übersicht über Interaktionen von genetischen und exogenen Faktoren. Einige Fragen bleiben jedoch weiterhin ungeklärt, und die Studie kann aufgrund von Einschränkungen, die im nächsten Kapitel angesprochen werden, keine allgemeine Gültigkeit beanspruchen.

#### 5.4 Limitationen der Studie

Für eine Genotypisierungsstudie ist die Patientenzahl von 45 klein und hat damit eine geringe Aussagekraft. Ebenfalls bezogen auf die Korrelationsanalysen der AB0-Blutgruppen ist die Kohortengröße mit 58 Patienten, bei denen die Blutgruppe bestimmt wurde, geringer als die Kohorte von beispielsweise Bianco et al. [15] mit 508 COVID-19-Patienten. Die Kontrollgruppe, die für eine Hardy-Weinberg-Analyse und das Case-Control-Matching verwendet wurde, wies zwar auf der einen Seite ähnliche Charakteristika auf, auf der anderen Seite lagen uns allerdings keine Informationen vor, ob sich diese Blutspender im Verlauf ebenfalls mit SARS-CoV-2 infizierten.

Eine Leberbeteiligung während COVID-19 wurde bisher in der Literatur definiert als jeglicher Leberschaden im zeitlichen Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion [nach 79]. Das ist eine grobe Definition, die nicht zwischen den multiplen weiteren Ursachen einer Leberparametererhöhung, wie zum Beispiel der medikamentös-induzierten Hepatitis, unterscheidet. Aufgrund der unvollständigen anamnestischen Daten und den akuten Umständen, unter denen ein Großteil der Patienten zu Beginn der ersten Infektionswelle im März und April 2020 hospitalisiert worden waren, lagen nur wenige Informationen über potenziell hepatotoxische Medikamente oder einen Alkoholabusus vor, sodass diese Einflüsse nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus sind die genetischen Effekte nicht durch Leberbiopsien evaluiert worden. Von den am UKS verstorbenen Patienten wurden im Zeitraum der Studie nur zwei obduziert, wobei keine histopathologische Analyse der Leber durchgeführt wurde. Anders als bei Anastasiou et al. [5] oder Sonzogni et al. [108], die histopathologisch luminale Thrombosen, portale Fibrose und Virus-DNA in Endothelzellen der Leber bei 15 von 22 an COVID-19 verstorbenen Patienten nachwiesen, konnte der Lebertropismus in dieser Kohorte nicht sicher beurteilt werden.

Eine Schwäche der statistischen Analyse ist, dass Leberfunktionstests bei schwerkranken Patienten auf der Intensivstation tendenziell häufiger durchgeführt worden sind als bei Patienten auf der Normalstation. Die jeweilige Labordiagnostik der Patienten in unterschiedlichen Zeitabständen führte dazu, dass in den Streudiagrammen das Verhältnis von Werten und Patienten nicht ausgeglichen ist. Daher ist ein Bias bei den Loess-Graphen aufgrund der stärkeren Gewichtung der Schwerkranken denkbar.

Die allgemeingültige Aussagekraft der Parameteranalysen ist außerdem aufgrund der definierten Grenzwerte eingeschränkt, da die Normen sich international stark unterscheiden. Die darauf basierenden Korrelationsanalysen zum Schweregrad der Erkrankung könnten außerdem verzerrt sein, weil das Versterben nur während der Hospitalisierung erfasst wurde. Es lagen keine Informationen über die post-stationäre Genesung im häuslichen Umfeld oder in Rehabilitations- oder Pflegeanstalten vor, sodass die Hypothesen der Risikofaktoren nicht nachträglich verifiziert wurden.

### 5.5 Ausblick

Im klinischen Alltag sollte auf das Auftreten von Leberfunktionsstörungen bei Patienten mit COVID-19-Infektion geachtet werden. Um bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung Patienten gemäß ihrer Prädisposition adäquat behandeln und überwachen zu können, wird empfohlen, AST,  $\gamma$ -GT und die nicht-invasiven Scores (FIB-4, APRI) als Biomarker für ein Screening bei stationären Patienten einzusetzen. Sie könnten sowohl als Prognosemarker bei Aufnahme als auch als Verlaufparameter nützlich sein, um eine frühe Identifizierung schwerer Krankheitsverläufe zu ermöglichen. Generell sollten für die Leberwerte engmaschigere Kontrollen vorrangig für Patienten in Stadium 2 und 3 von COVID-19 erfolgen, um eine mögliche andauernde Leberschädigung nicht zu übersehen.

Darüber hinaus sollte in Betracht gezogen werden, Infizierte mit bereits vorliegenden Risikofaktoren wie erhöhtes Alter über 65 Jahre, kardiovaskulären Vorerkrankungen oder einem Diabetes mellitus zusätzlich auf die Blutgruppe, den *MBOAT7*-Polymorphismus und den Vitamin D-Status zu testen. Dies könnte helfen, gezielt diejenigen zu überwachen, die das höchste Risiko für einen progredienten Krankheitsverlauf haben und die daher von einer frühzeitigen Behandlung profitieren. Therapeutisch könnte eine Vitamin D-Supplementierung bei COVID-19-Patienten mit entsprechendem Mangel in Betracht gezogen werden.

Chow et al. [24] zeigten außerdem, dass eine Acetylsalicylsäure (ASS)-Therapie innerhalb von 24 Stunden der Krankenhausaufnahme das Risiko einer invasiven Beatmung, der intensivmedizinischen Therapie und die Krankenhausmortalität von COVID-19-Patienten signifikant senken konnte. Eine Behandlung mit ASS könnte vor allem für diejenigen COVID-19-Patienten von Nutzen sein, die Träger der *MBOAT7*-Allelvariante sind. *MBOAT7* kodiert für die Lysophospholipid-Acyltransferase 7, welche eine wichtige Rolle im Arachidonsäure-Metabolismus der inflammatorisch wirkenden neutrophilen Granulozyten innehat [42]. Arachidonsäure fungiert als Ausgangssubstanz für die Synthese der Eicosanoide: Die Cyclooxygenase katalysiert die Synthese der Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane, während die 5-Lipoxygenase die Synthese der Leukotriene katalysiert. Das Enzym Lysophospholipid-Acyltransferase 7 reguliert die Menge an freier Arachidonsäure, indem sie sie in Phospholipide einfügt. Somit ist Arachidonsäure nicht mehr für die Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen verfügbar, die für eine Inflammation in Hepatozyten und anderen Organen mitverantwortlich sind [42]. Liegt je-

doch die Minor-Allelvariante von *MBOAT7* vor, kommt es zu einer Fehlregulierung und zu einem Anstieg der Arachidonsäure, was folglich mit einer höheren Konzentration an Prostaglandinen und Leukotrienen und somit einer stärkeren Entzündung einhergeht. Der therapeutische Nutzen von ASS ist mutmaßlich darin begründet, dass es die Cyclooxygenase und somit die Synthese der Prostaglandine hemmt. Bei ASS-Gabe überwiegen häufig die Leukotriene, da ASS nicht gleichzeitig die Lipoxygenase hemmt [92]. Ein Ansatz wäre hier die Gabe des Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten Montelukast, welcher die Wirkung der Leukotriene aufhebt und so Entzündungsprozesse hemmt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die tägliche Behandlung von Patienten mit MAFLD mit ASS das Risiko verringert, eine NASH und im Verlauf eine Leberfibrose zu entwickeln [106]. Um einen möglichen positiven therapeutischen Nutzen von ASS oder Montelukast bei COVID-19-Patienten mit *MBOAT7*-Genvariante zu beweisen, sind weitere Studien erforderlich.

Größere Follow-up-Studien sind außerdem notwendig, um die Langzeitfolgen von SARS-CoV-2 mit besonderem Blick auf die Leberbeteiligung zu erkennen. Vorrangig Patienten mit ARDS und intensivmedizinisch Behandelte sollten in Langzeitstudien aufgenommen werden, um eine potenzielle Fibroseentwicklung oder Komplikationen der Hepatopathie frühzeitig zu erkennen. Zukünftige multizentrische Studien werden außerdem erforderlich sein, um das Potenzial der Leberparameter zur Vorhersage klinischer Auswirkungen von COVID-19 zu ermitteln.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der AB0-Blutgruppen	20
Tabelle 2: analysierte Laborwerte	23
Tabelle 3: Auflistung der SNPs	24
Tabelle 4: Reagenzien für einen Ansatz des TaqMan-Genotypisierungsassays	30
Tabelle 5: PCR-Programm für Allelische Diskriminierung	31
Tabelle 6: Reagenzien für einen Ansatz der PCR der Primeretablierung	34
Tabelle 7: PCR-Programm der Primeretablierung	34
Tabelle 8: Ergebnisse der Primeretablierung	35
Tabelle 9: Reagenzien für einen Ansatz der Sanger-Sequenzierung	35
Tabelle 10: PCR-Programm der Sanger-Sequenzierung	35
Tabelle 11: Reagenzien für einen Ansatz des BigDye Cycle-Sequencing	36
Tabelle 12: PCR-Programm des BigDye Cycle-Sequencing	37
Tabelle 13: Referenzbereiche der Laborparameter nach Angaben des UKS-Zentrallabors (geschlechtsspezifische Abweichungen sind fett markiert)	48
Tabelle 14: Häufigkeit der Genotypen PiS (rs17580), PiZ (rs28929474) und des <i>SERPINA1</i> -Polymorphismus	75
Tabelle 15: Häufigkeit der Genotypen von <i>PNPLA3</i> (rs738409), <i>MBOAT7</i> (rs641738), <i>TM6SF2</i> (rs58542926)	77
Tabelle 16: Häufigkeit der Genotypen von <i>AMDHD1</i> (rs10745742), <i>CYP24A1</i> (rs17216707), <i>SEC23A</i> (rs8018720), <i>GC</i> (rs7041), <i>DHCR7</i> (rs12800438), <i>CYP2R1</i> (rs10741657)	77
Tabelle 17: Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die <i>MBOAT7</i> -Variante	80
Tabelle 18: Ergebnisse der Genotypisierung rs641738	81
Tabelle 19: Patientenanzahl nach Anzahl der Risikoallele im <i>MBOAT7</i> -, <i>PNPLA3</i> - und <i>TM6SF2</i> -Gen	92
Tabelle 20: AB0-Blutgruppenbestimmung basierend auf DNA-Sequenzvariationsanalyse	95

Tabelle 21: Blutgruppenverteilung im Vergleich zur Kontrollkohorte

96

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des SARS-CoV-2, des viralen Spike-Proteins und der Spaltstellen für Furin und TMPRSS2	5
Abbildung 2:	Schematischer Krankheitsverlauf COVID-19	6
Abbildung 3:	Fluoreszenzmessung durch Energietransfer	29
Abbildung 4:	Ablauf eines TaqMan® SNP-Genotypisierungsassays	30
Abbildung 5:	Plot der allelischen Diskriminierung am Beispiel der Genotypisierung der Kontrollgruppen des SNPs im MBOAT7-Gen	32
Abbildung 6:	Gelelektrophorese der PCR für die Sanger-Sequenzierung	36
Abbildung 7:	Elektropherogramm von rs8176719 zeigt die Heterozygotie des Allels an	38
Abbildung 8:	Altersverteilung der Kohorte	41
Abbildung 9:	Altersverteilung nach Geschlecht	42
Abbildung 10:	Anzahl der Patienten mit Leberparametern >ULN, gruppiert nach Geschlecht	45
Abbildung 11:	Anzahl der Patienten mit pathologisch erhöhten Leberparametern im Verlauf gruppiert nach ICU-Aufenthalt	46
Abbildung 12:	Anzahl der Patienten mit pathologisch erhöhten Leberparametern im Verlauf gruppiert nach Beatmungspflichtigkeit	47
Abbildung 13:	Verlauf der AST-Werte [U/l] von 46 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph	49
Abbildung 14:	Verlauf der ALT-Werte [U/l] von 61 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph	50
Abbildung 15:	Verlauf der AP-Werte [U/l] von 61 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph	51
Abbildung 16:	Verlauf der $\gamma$ -GT-Werte [U/l] von 60 Patienten über 206 Tage mit Loess-Regressionsgraph	52
Abbildung 17:	Verlauf der Bilirubin-Werte [mg/dl] von 61 Patienten über 216 Tage mit Loess-Regressionsgraph	53
Abbildung 18:	Verlauf der Albumin-Werte [g/l] von 61 Patienten über 183 Tage mit Loess-Regressionsgraph	54

Abbildung 19:	Verlauf der INR-Werte von 61 Patienten über 205 Tage mit Loess-Regressiongraph	55
Abbildung 20:	De-Ritis-Quotient im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	56
Abbildung 21:	FIB-4-Score im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	57
Abbildung 22:	Boxplot von FIB-4-Score nach ICU	58
Abbildung 23:	Boxplot von FIB-4 nach Versterben	58
Abbildung 24:	APRI-Score im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	59
Abbildung 25:	Boxplot von APRI-Score nach COVID-19-Pneumonie	60
Abbildung 26:	Boxplot von APRI-Score nach ICU-Behandlung	60
Abbildung 27:	Boxplot von APRI-Score nach Versterben	61
Abbildung 28:	Kaplan-Meier-Kurve: Häufigkeit des Überschreitens des zweifachen ULN von AST nach Beatmung	65
Abbildung 29:	Kaplan-Meier-Kurve: Häufigkeit des Überschreitens des zweifachen ULN von AST nach Versterben	66
Abbildung 30:	Häufigkeit des Überschreitens des ULN von $\gamma$ -GT nach COVID-19-Pneumonie	67
Abbildung 31:	Häufigkeit des Überschreitens des ULN von $\gamma$ -GT nach Beatmungstyp	68
Abbildung 32:	LDH-Werte im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	69
Abbildung 33:	LDH/AST-Ratio im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	70
Abbildung 34:	IL-6 im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	71
Abbildung 35:	CRP-Werte im Verlauf mit Loess-Regressiongraph	72
Abbildung 36:	Vergleich der Patienten mit Vitamin-D-Mangel in ICU-Behandlung	73
Abbildung 37:	De Finetti-Diagramm mit <i>SERPINA1</i> -Allelfrequenzen und Genotypenfrequenzen bei COVID19-Fällen (blau) und Kontrollen (schwarz)	78
Abbildung 38:	Häufigkeit der <i>MBOAT7</i> -Genotypen	80
Abbildung 39:	Patientenanzahl mit pathologischen Leberparametern am Aufnahmetag nach <i>MBOAT7</i> -Genotyp	82
Abbildung 40:	Anteil der Patienten mit Covid-19-Pneumonie nach <i>MBOAT7</i> -Genotyp	83

Abbildung 41:	Prozentualer Anteil des <i>MBOAT7</i> -Genotyps nach intensivmedizinischer Behandlung	83
Abbildung 42:	Prozentualer Anteil des <i>MBOAT7</i> -Genotyps nach invasiver Beatmung	84
Abbildung 43:	Prozentualer Anteil des <i>MBOAT7</i> -Genotyps unter den verstorbenen Patienten	84
Abbildung 44:	Verlauf AP nach <i>MBOAT7</i> -Risikoallel mit Loess-Regressionsgraphen	85
Abbildung 45:	$\gamma$ -GT-Verlauf geschichtet nach <i>MBOAT7</i> -Risikoallel mit Loess- Regressionsgraphen	86
Abbildung 46:	ALT-Verlauf geschichtet nach <i>MBOAT7</i> -Risikoallel mit Loess- Regressionsgraphen	87
Abbildung 47:	Bilirubin-Verlauf geschichtet nach <i>MBOAT7</i> -Risikoallel mit Loess- Regressionsgraphen	88
Abbildung 48:	Albumin-Verlauf geschichtet nach <i>MBOAT7</i> -Risikoallel mit Loess- Regressionsgraphen	89
Abbildung 49:	Verlauf der CRP-Konzentration nach <i>MBOAT7</i> -Genotyp	90
Abbildung 50:	AP-Aktivität nach Anzahl der Risikoallele der Steatose-SNPs	92
Abbildung 51:	$\gamma$ -GT-Aktivität nach Anzahl der Risikoallele der Steatose-SNPs	92
Abbildung 52:	APRI nach Anzahl der Risikoallele	93
Abbildung 53:	IL-6-Konzentration nach Anzahl der Risikoallele	93
Abbildung 54:	AST-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	96
Abbildung 55:	ALT-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	97
Abbildung 56:	APRI-Score in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	98
Abbildung 57:	$\gamma$ -GT-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	99
Abbildung 58:	Albumin-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	100
Abbildung 59:	CRP-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	101
Abbildung 60:	IL-6-Verlauf in Abhängigkeit der AB0-Blutgruppe	102

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

25(OH)-Vitamin D	25-Hydroxycholecalciferol/Calcidiol
A1AT	$\alpha$ -1-Antitrypsin
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	acute respiratory distress syndrome (deutsch: akutes Atemnotsyndrom)
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaar
COVID-19	coronavirus disease 2019
CRP	C-reaktives Protein
DBP	Vitamin-D-Bindeprotein (group-specific component (GC) globulin)
ddNTP	2',3' - Didesoxynucleotidtriphosphat
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	2'- Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GWAS	Genome-wide association study (deutsch: genomweite Assoziationsstudie)
IL-2/6/7	Interleukin-2/6/7
LDH	Laktatdehydrogenase
LLN	lower limit of normal (deutsch: unterer Grenzwert)
LOESS	locally estimated scatterplot smoothing (deutsch: lokal gewichtete Streudiagrammglättung)
LPLAT7	Lysophospholipid-Acyltransferase 7
MAF	Minor Allele Frequency
MAFLD	metabolisch assoziierte Fettlebererkrankung
<i>MBOAT7</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 7
MCP1	monocyte chemotactic protein 1

MGB	Minor Groove Binder
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
PCR	polymerase chain reaction (deutsch: Polymerasekettenreaktion)
<i>PNPLA3</i>	patatin-like phospholipase domain containing 3
PRR	Pattern Recognition Receptor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SARS	severe acute respiratory syndrome (deutsch: Schweres Akutes Atemwegssyndrom)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (deutsch: Einzelnukleotid-Polymorphismus)
TBIL	total bilirubin (deutsch: Bilirubin gesamt)
<i>TM6SF2</i>	transmembrane 6 superfamily member 2
TMPRSS2	transmembrane protease serine subtype 2 (deutsch: transmembrane Serinprotease 2)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
ULN	upper limit of normal (deutsch: oberer Grenzwert)
VLDL	Very-Low-Density-Lipoproteinen
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase

---

## Literaturverzeichnis

1. AASLD CLINICAL BEST PRACTICE ADVICE FOR HEPATOLOGY AND LIVER TRANSPLANT PROVIDERS DURING THE COVID-19 PANDEMIC: AASLD EXPERT PANEL CONSENSUS STATEMENT. URL: <https://www.aasld.org/sites/default/files/2020-06/AASLD-COVID19-ExpertPanelConsensusStatement-June252020-v2-FINAL.pdf>
2. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L, Jacobs EJ, Ascherio A, Helzlsouer K, Jacobs KB, Li Q, Weinstein SJ, Purdue M, Virtamo J, Horst R, Wheeler W, Chanock S, Hunter DJ, Hayes RB, Kraft P, Albanes D (2010) Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 19:2739–2745
3. Aichinger E, Grimm T (2008) Hardy-Weinberg equilibrium: First description 100 years ago. *Medizinische Genet* 20:276–281
4. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M (2014) Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 61:1385–1396
5. Anastasiou OE, Korth J, Herbstreit F, Witzke O, Lange CM (2020) Mild vs severe liver injury in SARS-CoV-2 infection. *Dig Dis*
6. Arastéh K, Baenkler H BC et al. (2018) *Innere Medizin*. 4. edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
7. Arnemann J (2018) *Sanger-Sequenzierung*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9\\_3576-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9_3576-1)
8. Arnemann J (2019) *SNP*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3581](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3581)
9. Arnemann J (2019) *Polymorphismus*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3559](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3559)
10. Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ (2019) Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:269–281
11. Barlow A, Landolf KM, Barlow B, Yeung SYA, Heavner JJ, Claassen CW, Heavner MS (2020) Review of Emerging Pharmacotherapy for the Treatment of Coronavirus Disease 2019. *Pharmacotherapy* 40:416–437
12. Basuray S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis.

13. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ (2020) Severe Covid-19. *N Engl J Med*
14. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, Mittoo S, Weissert R, Kass JS, Rajagopal S, Pai AR, Kutty S (2020) Cytokine Storm in COVID-19—Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front Immunol* 11:1648
15. Bianco C, Baselli G, Malvestiti F, Santoro L, Pelusi S, Manunta M, Grasselli G, Bandera A, Scudeller L, Prati D, Valenti L (2020) Genetic insight into Covid-19 related liver injury. *Liver Int* 0–2
16. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, Miravittles M (2017) Alpha-1 antitrypsin Pi\*Z gene frequency and Pi\*ZZ genotype numbers worldwide: An update. *Int J COPD* 12:561–569
17. Bloom PP, Meyerowitz EA, Reinus Z, Daidone M, Gustafson J, Kim AY, Schaefer E, Chung RT (2020) Liver Biochemistries in Hospitalized Patients With COVID-19. *Hepatology* 0–3
18. Botros M, Sikaris KA (2013) The de Ritis ratio: The test of time. *Clin Biochem Rev* 34:117–130
19. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, Brosch M, Rosendahl J, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, McQuillin A, Frank J, Kiefer F, Schreiber S, Lieb W, Soyka M, Semmo N, Aigner E, Datz C, Schmelz R, Brückner S, Zeissig S, Stephan AM, Wodarz N, Devière J, Clumeck N, Sarrazin C, Lammert F, Gustot T, Deltenre P, Völzke H, Lerch MM, Mayerle J, Eyer F, Schafmayer C, Cichon S, Nöthen MM, Nothnagel M, Ellinghaus D, Huse K, Franke A, Zopf S, Hellerbrand C, Moreno C, Franchimont D, Morgan MY, Hampe J (2015) A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet* 47:1443–1448
20. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, Li Z, Zhou G, Gou J, Qu J, Sun Y, Liu Y, He Q, Chen J, Liu L, Xu L (2020) COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol*
21. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, Li Z, Zhou G, Gou J, Qu J, Sun Y, Liu Y, He Q, Chen J, Liu L, Xu L (2020) COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol* 73:566–574
22. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, Yuen KY (2020) Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 9:221–236
23. Chappell S, Hadzic N, Stockley R, Guetta-Baranes T, Morgan K, Kalsheker N (2007) A polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. *Hepatology* 47:127–132
24. Chappell S, Hadzic N, Stockley R, Guetta-Baranes T, Morgan K, Kalsheker N (2008) A

- polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. *Hepatology* 47:127–132
25. Chu DK, Akl EA, Duda S, Solo K, Yaacoub S, Schünemann HJ, El-harakeh A, Bognanni A, Lotfi T, Loeb M, Hajizadeh A, Bak A, Izcovich A, Cuello-Garcia CA, Chen C, Harris DJ, Borowiack E, Chamseddine F, Schünemann F, Morgano GP, Muti Schünemann GEU, Chen G, Zhao H, Neumann I, Chan J, Khabsa J, Hneiny L, Harrison L, Smith M, Rizk N, Giorgi Rossi P, AbiHanna P, El-khoury R, Stalteri R, Baldeh T, Piggott T, Zhang Y, Saad Z, Khamis A, Reinap M (2020) Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 395:1973–1987
  26. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1999) Erratum: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation (*Genome Research* (1998) 8 (1229-1231)). *Genome Res* 9:210
  27. Cooling L (2015) Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin Microbiol Rev* 28:801–870
  28. Corman VM, Lienau J, Witzenth M (2019) Coronaviruses as the cause of respiratory infections. *Internist* 60:1136–1145
  29. Crisafulli S, Isgro V, La Corte L, Atzeni F, Trifirò G (2020) Potential Role of Anti-interleukin (IL)-6 Drugs in the Treatment of COVID-19: Rationale, Clinical Evidence and Risks. *BioDrugs* 34:415–422
  30. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, Motta BM, Kaminska D, Rametta R, Grimaudo S, Pelusi S, Montalcini T, Alisi A, Maggioni M, Kärjä V, Borén J, Käkelä P, Di Marco V, Xing C, Nobili V, Dallapiccola B, Craxi A, Pihlajamäki J, Fargion S, Sjöström L, Carlsson LM, Romeo S, Valenti L (2015) Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 61:506–514
  31. Dreher M, Kersten A, Bickenbach J, Balfanz P, Hartmann B, Cornelissen C, Daher A, Stöhr R, Kleines M, Lemmen SW, Brokmann JC, Müller T, Müller-Wieland D, Marx G, Marx N (2020) The characteristics of 50 hospitalized COVID-19 patients with and without ARDS. *Dtsch Aerzteblatt Online* 117:
  32. Ellinghaus D et al., Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, Fernández J, Prati D, Baselli G, Asselta R, Grimsrud MM, Milani C, Aziz F, Kässens J, May S, Wendorff M, Wienbrandt L, Uellendahl-Werth F, Zheng T, Yi X, de Pablo R, Chercoles AG, Palom A, Garcia-Fernandez A-E, Rodriguez-Frias F, Zanella A, Bandera A, Protti A, Aghemo A, Lleo A, Biondi

- A, Caballero-Garralda A, Gori A, Tanck A, Carreras Nolla A, Latiano A, Fracanzani AL, Peschuck A, Julià A, Pesenti A, Voza A, Jiménez D, Mateos B, Nafria Jimenez B, Quereda C, Paccapelo C, Gassner C, Angelini C, Cea C, Solier A, Pestaña D, Muñoz-Diaz E, Sandoval E, Paraboschi EM, Navas E, García Sánchez F, Ceriotti F, Martinelli-Boneschi F, Peyvandi F, Blasi F, Téllez L, Blanco-Grau A, Hemmrich-Stanisak G, Grasselli G, Costantino G, Cardamone G, Foti G, Aneli S, Kurihara H, ElAbd H, My I, Galván-Femenia I, Martín J, Erdmann J, Ferrusquía-Acosta J, Garcia-Etxebarria K, Izquierdo-Sanchez L, Bettini LR, Sumoy L, Terranova L, Moreira L, Santoro L, Scudeller L, Mesonero F, Roade L, Rühlemann MC, Schaefer M, Carrabba M, Riveiro-Barciela M, Figuera Basso ME, Valsecchi MG, Hernandez-Tejero M, Acosta-Herrera M, D'Angiò M, Baldini M, Cazzaniga M, Schulzky M, Cecconi M, Wittig M, Ciccarelli M, Rodríguez-Gandía M, Bocciolone M, Miozzo M, Montano N, Braun N, Sacchi N, Martínez N, Özer O, Palmieri O, Faverio P, Preatoni P, Bonfanti P, Omodei P, Tentorio P, Castro P, Rodrigues PM, Blandino Ortiz A, de Cid R, Ferrer R, Gualtierotti R, Nieto R, Goerg S, Badalamenti S, Marsal S, Matullo G, Pelusi S, Juzenas S, Aliberti S, Monzani V, Moreno V, Wesse T, Lenz TL, Pumarola T, Rimoldi V, Bosari S, Albrecht W, Peter W, Romero-Gómez M, D'Amato M, Duga S, Banales JM, Hov JR, Folseraas T, Valenti L, Franke A, Karlsen TH, Severe Covid-19 GWAS Group (2020) Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med*
33. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, Kleiner DE, Brunt E, Bugianesi E, Yki-Järvinen H, Grønbaek H, Cortez-Pinto H, Fan J, Valenti L, Abdelmalek M, Romero-Gomez M, Rinella M, Arrese M, Bedossa P, Newsome PN, Anstee QM, Jalan R, Bataller R, Loomba R, Sookoian S, Sarin SK, Harrison S, Kawaguchi T, Wong VWS, Ratziu V, Yilmaz Y, Younossi Z (2020) MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158:1999-2014.e1
34. Esumi M, Ishibashi M, Yamaguchi H, Nakajima S, Tai Y, Kikuta S, Sugitani M, Takayama T, Tahara M, Takeda M, Wakita T (2015) Transmembrane serine protease TMPRSS2 activates hepatitis C virus infection. *Hepatology* 61:437–446
35. Fan Z, Chen L, Li J, Cheng X, Yang J, Tian C, Zhang Y, Huang S, Liu Z, Cheng J (2020) Clinical Features of COVID-19-Related Liver Functional Abnormality. *Clin Gastroenterol Hepatol* 18:1561–1566
36. Feldt T, Guggemos W, Heim K, Klug B, Lehnert R, Lübbert C, Niebank M, Pfäfflin F, Rothfuss K, Schmiedel S, Stegemann MS, Stich A, Trebesch I, Wolf T Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz-und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger am Robert Koch-Institut Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19 Für den STAKOB erarbeitet von.

37. Feng G, Zheng KI, Yan Q-Q, Rios RS, Targher G, Byrne CD, Poucke S Van, Liu W-Y, Zheng M-H (2020) COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. *J Clin Transl Hepatol* 8:1–7
38. Ferm S, Fisher C, Pakala T, Tong M, Shah D, Schwarzbaum D, Cooley V, Hussain S, Kim SH (2020) Analysis of Gastrointestinal and Hepatic Manifestations of SARS-CoV-2 Infection in 892 Patients in Queens, NY.
39. Frühbeck G, Baker JL, Busetto L, Dicker D, Goossens GH, Halford JCG, Handjieva-Darlenska T, Hassapidou M, Holm J-C, Lehtinen-Jacks S, Mullerova D, O'Malley G, Sagen JV, Rutter H, Salas XR, Woodward E, Yumuk V, Farpour-Lambert NJ (2020) European Association for the Study of Obesity Position Statement on the Global COVID-19 Pandemic. *Obes Facts* 13:292–296
40. Geier A, Fickert P, Trauner M Mechanisms of Disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. REVIEW
41. Gérard C, Maggipinto G, Minon JM (2020) COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint. *Br J Haematol* 190:e93–e94
42. Gijón MA, Riekhof WR, Zarini S, Murphy RC, Voelker DR (2008) Lysophospholipid Acyltransferases and Arachidonate Recycling in Human Neutrophils. *J Biol Chem* 283:30235
43. Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, Baggerly CA, French CB, Aliano JL, Bhattoa HP (2020) Evidence that vitamin d supplementation could reduce risk of influenza and covid-19 infections and deaths. *Nutrients* 12:1–19
44. Grimaudo S, Amodio E, Pipitone RM, Maida CM, Pizzo S, Prestileo T, Tramuto F, Sardina D, Vitale F, Casuccio A, Craxì A (2020) PNPLA3 and TLL-1 polymorphisms affect disease severity in patients with COVID-19
45. Grünhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Höblinger A, Obermayer-Pietsch B, Geisel J, Trauner M, Sauerbruch T, Lammert F (2012) Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology* 56:1883–1891
46. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, Liu L, Shan H, Lei C, Hui DSC, Du B, Li L, Zeng G, Yuen K-Y, Chen R, Tang C, Wang T, Chen P, Xiang J, Li S, Wang J, Liang Z, Peng Y, Wei L, Liu Y, Hu Y, Peng P, Wang J, Liu J, Chen Z, Li G, Zheng Z, Qiu S, Luo J, Ye C, Zhu S, Zhong N (2020) Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382:1708–1720
47. Guillon P, Clément M, Sébille V, Rivain JG, Chou CF, Ruvoën-Clouet N, Le Pendu J (2008) Inhibition of the interaction between the SARS-CoV Spike protein and its cellular receptor by anti-histo-blood group antibodies. *Glycobiology* 18:1085–1093

48. Halász T, Horváth G, Kiss A, Pár G, Szombati A, Gelley F, Nemes B, Kenessey I, Piurkó V, Schaff Z (2016) Evaluation of Histological and non-Invasive Methods for the Detection of Liver Fibrosis: The Values of Histological and Digital Morphometric Analysis, Liver Stiffness Measurement and APRI Score. *Pathol Oncol Res* 22:1–6
49. Hastie CE, Mackay DF, Ho F, Celis-Morales CA, Katikireddi SV, Niedzwiedz CL, Jani BD, Welsh P, Mair FS, Gray SR, O'Donnell CA, Gill JM, Sattar N, Pell JP (2020) Vitamin D concentrations and COVID-19 infection in UK Biobank. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 14:561–565
50. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26:672–675
51. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Schirin-Sokhan R, Wilkens G, Geier A, Lorenzen J, Köhl J, Gressner AM, Matern S, Lammert F (2005) Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 37:835–843
52. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271-280.e8
53. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S (2020) A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell* 78:779-784.e5
54. Hollis BW (2005) Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: Implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *American Institute of Nutrition* URL: <https://academic.oup.com/jn/article/135/2/317/4663651>
55. Iruzubieta P, Terán Á, Crespo J, Fábrega E (2014) Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World J Hepatol* 6:901–915
56. Jakovac H (2020) COVID-19 and vitamin D-Is there a link and an opportunity for intervention? *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 318:E589
57. Janciauskiene S, Welte T (2016) Well-known and less well-known functions of Alpha-1 antitrypsin: Its role in chronic obstructive pulmonary disease and other disease developments. *Ann Am Thorac Soc* 13:S280–S288
58. Ji D, Qin E, Xu J, Zhang D, Cheng G, Wang Y, Lau G (2020) Non-alcoholic fatty liver diseases in patients with COVID-19: A retrospective study. *J Hepatol* 3–5

59. Jiang X, O'Reilly PF, Aschard H, Hsu YH, Richards JB, Dupuis J, Ingelsson E, Karasik D, Pilz S, Berry Di, Kestenbaum B, Zheng J, Luan J, Sofianopoulou E, Streeten EA, Albanes D, Lutsey PL, Yao L, Tang W, Econs MJ, Wallaschofski H, Völzke H, Zhou A, Power C, McCarthy MI, Michos ED, Boerwinkle E, Weinstein SJ, Freedman ND, Huang WY, Van Schoor NM, Van Der Velde N, Groot LCPGMD, Enneman A, Cupples LA, Booth SL, Vasani RS, Liu CT, Zhou Y, Ripatti S, Ohlsson C, Vandenput L, Lorentzon M, Eriksson JG, Shea MK, Houston DK, Kritchevsky SB, Liu Y, Lohman KK, Ferrucci L, Peacock M, Gieger C, Beekman M, Slagboom E, Deelen J, Heemst Di Van, Kleber ME, März W, De Boer IH, Wood AC, Rotter JI, Rich SS, Robinson-Cohen C, Den Heijer M, Jarvelin MR, Cavadino A, Joshi PK, Wilson JF, Hayward C, Lind L, Michaëlsson K, Trompet S, Zillikens MC, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Broer L, Zgaga L, Campbell H, Theodoratou E, Farrington SM, Timofeeva M, Dunlop MG, Valdes AM, Tikkanen E, Lehtimäki T, Lyytikäinen LP, Kähönen M, Raitakari OT, Mikkilä V, Ikram MA, Sattar N, Jukema JW, Wareham NJ, Langenberg C, Forouhi NG, Gundersen TE, Khaw KT, Butterworth AS, Danesh J, Spector T, Wang TJ, Hyppönen E, Kraft P, Kiel DP (2018) Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nat Commun* 9:
60. Jomaa H (2019) *Vitamin D*. Springer, Berlin, Heidelberg URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3266](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48986-4_3266)
61. Kleesiek K, Götting C, Diekmann J, Dreier J, Schmidt M (2019) *AB0-Blutgruppensystem*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48986-4\\_55](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48986-4_55)
62. Koo BK, An JN, Joo SK, Kim D, Lee S, Bae JM, Park JH, Kim JH, Chang MS, Kim W (2020) Association Between a Polymorphism in MBOAT7 and Chronic Kidney Disease in Patients With Biopsy-Confirmed Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 18:2837-2839.e2
63. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, Vogt TF, Hobbs HH, Cohen JC (2014) Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 46:352–356
64. Krause G, Scherer G, Müller M, Weiß T (2012) *Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR)* [Biomonitoring Methods in German language, 2004]. American Cancer Society URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600418.bipcrbasicd0016>
65. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg RM, Bantel H, Pathil A, Demir M, Kluwe J, Boettler T, Lammert F, Geier AA (2017) Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: A multicenter biopsy-based study1. *J Lipid Res* 58:247–255

66. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, Wongsiriroy N, Nagy HM, Ivanova PT, Scott SA, Knittelfelder O, Rechberger GN, Birner-Gruenberger R, Eder S, Brown HA, Haemmerle G, Oberer M, Lass A, Kershaw EE, Zimmermann R, Zechner R (2012) Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab* 15:691–702
67. Lagana SM, Kudose S, Iuga AC, Lee MJ, Fazlollahi L, Remotti HE, Del A, Simona P, Anne DM, Gonzalez K De, Saqi A, Khairallah P, Chong AM, Park H, Jay AU, Elizabeth HL (2020) Hepatic pathology in patients dying of COVID-19: a series of 40 cases including clinical, histologic, and virologic data. *Mod Pathol* 2:2147–2155
68. Lei F, Liu YM, Zhou F, Qin JJ, Zhang P, Zhu L, Zhang XJ, Cai J, Lin L, Ouyang S, Wang X, Yang C, Cheng X, Liu W, Li H, Xie J, Wu B, Luo H, Xiao F, Chen J, Tao L, Cheng G, She ZG, Zhou J, Wang H, Lin J, Luo P, Fu S, Zhou J, Ye P, Xiao B, Mao W, Liu L, Yan Y, Liu L, Chen G, Li H, Huang X, Zhang BH, Yuan Y (2020) Longitudinal association between markers of liver injury and mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* 0–2
69. Li Y, Id O, Li Y, Regan J, Fajnzylber J, Coxen K, Corry H, Wong C, Rosenthal A, Atyeo C, Fischinger S, Gillespie E, Chishti R, Baden L, Alter G, Kim A, Diseases I, Diseases I, Hospital MG, Street L Liver fibrosis index FIB-4 is associated with mortality in COVID-19. 0–1
70. Li Y, Li H, Zhu S, Xie Y, Wang B, He L, Zhang D, Zhang Y, Yuan H, Wu C, Sun W, Zhang Y, Li M, Cui L, Cai Y, Wang J, Yang Y, Lv Q, Zhang L, Xie M (2020) Prognostic Value of Right Ventricular Longitudinal Strain in Patients With COVID-19. *JACC Cardiovasc Imaging* 13:2287–2299
71. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, Silveira A, Franco-Cereceda A, Hamsten A, Eriksson P, Van't Hooft F (2014) TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8913–8918
72. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, Borén J, Montalcini T, Pujia A, Wiklund O, Hindy G, Spagnuolo R, Motta BM, Pipitone RM, Craxì A, Fargion S, Nobili V, Käkelä P, Kärjä V, Männistö V, Pihlajamäki J, Reilly DF, Castro-Perez J, Kozlitina J, Valenti L, Romeo S (2016) The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* 150:1219-1230.e6
73. Mang S, Kaddu-Mulindwa D, Metz C, Becker A, Seiler F, Smola S, Maßmann A, Becker SL, Papan C, Bals R, Lepper PM, Danziger G (2020) Pneumocystis jirovecii Pneumonia and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Coinfection in a Patient With Newly Diagnosed HIV-1 Infection. *Clin Infect Dis*

74. Martinez MA, Vuppalanchi R, Fontana RJ, Stolz A, Kleiner DE, Hayashi PH, Gu J, Hoofnagle JH, Chalasani N (2015) Clinical and histologic features of azithromycin-induced liver injury. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:369-376.e3
75. Medecine I of (1997) Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. The National Academies Press, Washington, DC
76. Medecine I of (2011) Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. The National Academies Press, Washington, DC
77. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395:1033–1034
78. Meszaros M, Meunier L, Morquin D, Klouche K, Fesler P, Malezieux E, Makinson A, Le Moing V, Reynes J, Pageaux GP (2020) Abnormal liver tests in patients hospitalized with Coronavirus disease 2019: Should we worry? *Liver Int* 40:1860–1864
79. Mishra K, Naffouj S, Gorgis S, Ibrahim H, Gill S, Fadel R, Chatfield A, Tang A, Salgia R (2020) Liver Injury as a Surrogate for Inflammation and Predictor of Outcomes in COVID-19. *Hepatol Commun* 0:1–9
80. Mitsuyoshi H, Yasui K, Hara T, Taketani H, Ishiba H, Okajima A, Seko Y, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Minami M, Itoh Y (2017) Hepatic nucleotide binding oligomerization domain-like receptors pyrin domain-containing 3 inflammasomes are associated with the histologic severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 47:1459–1468
81. Moon AM, Webb GJ, Aloman C, Armstrong MJ, Cargill T, Dhanasekaran R, Genescà J, Gill US, James TW, Jones PD, Marshall A, Mells G, Perumalswami P V., Qi X, Su F, Ufere NN, Barnes E, Barritt AS, Marjot T (2020) High mortality rates for SARS-CoV-2 infection in patients with pre-existing chronic liver disease and cirrhosis: Preliminary results from an international registry. *J Hepatol* 73:705–708
82. Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, Dixon ED, Lax SF, Trauner M (2020) Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int* liv.14730
83. Pereira M, Dantas Damascena A, Galvão Azevedo LM, de Almeida Oliveira T, da Mota Santana J (2020) Vitamin D deficiency aggravates COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–9
84. Perlmutter DH, Brodsky JL, Balistreri WF, Trapnell BC (2007) Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency-associated liver disease: A meeting review. *Hepatology* 45:1313–1323
85. Peterlik M, Cross HS (2005) Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 35:290–304

86. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Marco V Di, Bono A, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxi A (2010) Low vitamin d serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 51:1158–1167
87. Phipps MM, Barraza LH, LaSota ED, Sobieszczyk ME, Pereira MR, Zheng EX, Fox AN, Zucker J, Verna EC (2020) Acute Liver Injury in COVID-19: Prevalence and Association with Clinical Outcomes in a Large US Cohort. *Hepatology* hep.31404
88. Pletz MW, Terkamp C, Schumacher U, Rohde G, Schütte H, Welte T, Bals R, Krüger S, Frechen D, Knüppel W, Armari I, Suttorp N, Schütte H, Creutz P, Bauer T, Hecht J, Pankow W, Lies A, Thiemig D, Hauptmeier B, Wehde D, Suermann M, Ewig S, Prediger M, Zernia G, Welte T, Rademacher J, Barten G, Abrahamczik M, Naim J, Kröner W, Illig T, Klopp N, Kroegel C, Pletz M, Bals R, Dalhoff K, Schütz S, Hörster R, Rohde G, Petermann W, Buschmann H, Kröning R, Aydin Y, Schaberg T, Hering I, Marre R, Schumann C, Von Baum H, Illmann T, Wallner M, Burghuber O, Rainer G, Stolz D (2014) Vitamin D deficiency in community-acquired pneumonia: Low levels of 1,25(OH)<sub>2</sub> D are associated with disease severity. *Respir Res* 15:1–8
89. Portincasa P, Krawczyk M, Machill A, Lammert F, Di Ciaula A (2020) Hepatic consequences of COVID-19 infection. Lapping or biting? *Eur J Intern Med* 0–1
90. Qi F, Qian S, Zhang S, Zhang Z (2020) Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem Biophys Res Commun* 526:135–140
91. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS (2020) Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 71:762–768
92. Randerath WJ, Galetke W (2007) Übersichtsarbeit: Differenzialdiagnose der rezidivierenden polyposis nasi: Das analgetika-asthma-syndrom. *Dtsch Arztebl* 104:3178–3183
93. Redd WD, Zhou JC, Hathorn KE, McCarty TR, Bazarbashi AN, Thompson CC, Shen L, Chan WW (2020) Prevalence and Characteristics of Gastrointestinal Symptoms in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in the United States: A Multicenter Cohort Study. *Gastroenterology* 159:765-767.e2
94. Redd WD, Zhou JC, Hathorn KE, McCarty TR, Bazarbashi AN, Thompson CC, Shen L, Chan WW (2020) Prevalence and Characteristics of Gastrointestinal Symptoms in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in the United States: A Multicenter Cohort Study. *Gastroenterology* 159:765-767.e2
95. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ,

- Duer-Hefe J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Koziel ZM, Marrast LM, Mogavero JN, Osorio GA, Qiu M, Zanos TP (2020) Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 323:2052
96. Ridruejo E, Soza A (2020) The liver in times of COVID-19: What hepatologists should know. *Ann Hepatol* 19:353–358
97. RKI RKI - Gesundheit A-Z - Antworten des Robert Koch-Instituts auf häufig gestellte Fragen zu Vitamin D. URL: [https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Vitamin\\_D/Vitamin\\_D\\_FAQ-Liste.html](https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Vitamin_D/Vitamin_D_FAQ-Liste.html)
98. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40:1461–1465
99. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–7
100. Saunders GC, Parkes HC, editors (1999) Chapter 4 Quantification of Total DNA by Spectroscopy. The Royal Society of Chemistry URL: <http://dx.doi.org/10.1039/9781847559296-00047>
101. Schaefer EAK, Arvind A, Bloom PP, Chung RT (2020) Interrelationship Between Coronavirus Infection and Liver Disease. *Clin Liver Dis* 15:175–180
102. Schattenberg JM, Labenz C, Wörns MA, Menge P, Weinmann A, Galle PR, Sprinzl MF (2020) Patterns of liver injury in COVID-19 – a German case series. *United Eur Gastroenterol J* 8:
103. Schattenberg JM, Labenz C, Wörns MA, Menge P, Weinmann A, Galle PR, Sprinzl MF (2020) Patterns of liver injury in COVID-19 – a German case series. *United Eur Gastroenterol J*
104. Shahid Z, Kalayanamitra R, McClafferty B, Kepko D, Ramgobin D, Patel R, Aggarwal CS, Vunnam R, Sahu N, Bhatt D, Jones K, Golamari R, Jain R (2020) COVID-19 and Older Adults: What We Know. *J Am Geriatr Soc* 68:926–929
105. Siddiqi HK, Mehra MR (2020) COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J Hear Lung Transplant* 39:405–407
106. Simon TG, Henson J, Osganian S, Masia R, Chan AT, Chung RT, Corey KE (2019) Daily Aspirin Use Associated With Reduced Risk For Fibrosis Progression In Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17:2776-2784.e4
107. Singh S, Khan A (2020) Clinical Characteristics and Outcomes of Coronavirus Disease 2019 Among Patients With Preexisting Liver Disease in the United States: A Multicenter Research

- Network Study. *Gastroenterology* 159:768-771.e3
108. Sonzogni A, Previtali G, Seghezzi M, Grazia Alessio M, Gianatti A, Licini L, Morotti D, Zerbi P, Carsana L, Rossi R, Lauri E, Pellegrinelli A, Nebuloni M (2020) Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver Int* 40:2110–2116
  109. Stender S, Loomba R (2020) PNPLA3 Genotype and Risk of Liver and All-Cause Mortality. *Hepatology* 71:777–779
  110. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, Sulkowski MS, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D (2006) Development of a Simple Noninvasive Index to Predict Significant Fibrosis in Patients With HIV/HCV Coinfection Mark Nelson 11 for the APRICOT Clinical Investigators. *HEPATOLOGY* 43:1317–1325
  111. Stone H, Pye A, Stockley RA (2014) Disease associations in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir Med* 108:338–343
  112. Strushkevich N, Usanov SA, Plotnikov AN, Jones G, Park HW (2008) Structural Analysis of CYP2R1 in Complex with Vitamin D3. *J Mol Biol* 380:95–106
  113. Sultan S, Altayar O, Siddique SM, Davitkov P, Feuerstein JD, Lim JK, Falck-Ytter Y, El-Serag HB (2020) AGA Institute Rapid Review of the Gastrointestinal and Liver Manifestations of COVID-19, Meta-Analysis of International Data, and Recommendations for the Consultative Management of Patients with COVID-19. *Gastroenterology* 159:320-334.e27
  114. Technologies A (2016) Blood Mini Handbook QIAGEN Sample and Assay Technologies.
  115. Thabet K, Lik Yuen Chan H, Petta S, Mangia A, Berg T, Boonstra A, Brouwer WP, Lorena Abate M, Wai-Sun Wong V, Nazmy M, Fischer J, Liddle C, George J, Eslam M (2017) The Membrane-Bound O-Acyltransferase Domain-Containing 7 Variant rs641738 Increases Inflammation and Fibrosis in Chronic Hepatitis B.
  116. Tong JY, Wong A, Zhu D, Fastenberg JH, Tham T The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol Neck Surg* 2020:3–11
  117. Trauner M, Fickert P, Stauber R (2003) Sepsis und leber. *Intensivmed und Notfallmedizin* 40:475–483
  118. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG Primer3-new capabilities and interfaces.
  119. Valenti L, Jamialahmadi O, Romeo S (2020) Lack of genetic evidence that fatty liver disease predisposes to COVID-19. *J Hepatol* 1–3

120. Valenti L, Villa S, Baselli G, Temporiti R, Bandera A, Scudeller L, Prati D (2020) Association of ABO blood group and secretor phenotype with severe COVID-19. *Transfusion* 3067–3070
121. von Kalle C, Thun S, Vehreschild J (2020) Bericht: Nationales Forschungsnetzwerk der Universitätsmedizin zu Covid-19 (NaFoUniMedCovid19).
122. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok ASF (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:518–526
123. Wang B, Tontonoz P (2019) Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 81:165–188
124. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z (2020) Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc* 323:1061–1069
125. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, Van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Peltonen L, Cooper JD, O'Reilly PF, Houston DK, Glazer NL, Vandemput L, Peacock M, Shi J, Rivadeneira F, McCarthy MI, Anneli P, De Boer IH, Mangino M, Kato B, Smyth DJ, Booth SL, Jacques PF, Burke GL, Goodarzi M, Cheung CL, Wolf M, Rice K, Goltzman D, Hidiroglou N, Ladouceur M, Wareham NJ, Hocking LJ, Hart D, Arden NK, Cooper C, Malik S, Fraser WD, Hartikainen AL, Zhai G, Macdonald HM, Forouhi NG, Loos RJF, Reid DM, Hakim A, Dennison E, Liu Y, Power C, Stevens HE, Jaana L, Vasani RS, Soranzo N, Bojunga J, Psaty BM, Lorentzon M, Foroud T, Harris TB, Hofman A, Jansson JO, Cauley JA, Uitterlinden AG, Gibson Q, Järvelin MR, Karasik D, Siscovick DS, Econs MJ, Kritchevsky SB, Florez JC, Todd JA, Dupuis J, Hyppönen E, Spector TD (2010) Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet* 376:180–188
126. Wang Y, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J (2020) SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol* 807–816
127. Williamson E, Walker AJ, Bhaskaran KJ, Bacon S, Bates C, Morton CE, Curtis HJ, Mehrkar A, Evans D, Inglesby P, Cockburn J, McDonald HI, MacKenna B, Tomlinson L, Douglas IJ, Rentsch CT, Mathur R, Wong A, Grieve R, Harrison D, Forbes H, Schultze A, Croker RT, Parry J, Hester F, Harper S, Perera R, Evans S, Smeeth L, Goldacre B (2020) COVID-19/SARS-CoV-2 News from Preprints; OpenSAFELY: factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. *medRxiv* 373
128. Wu Z, McGoogan JM (2020) Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus

- Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - J Am Med Assoc* 323:1239–1242
129. Xie J, Yang L, Tian L, Li W, Yang L, Li L (2016) Macrophage Migration Inhibitor Factor Upregulates MCP-1 Expression in an Autocrine Manner in Hepatocytes during Acute Mouse Liver Injury. *Sci Rep* 6:1–12
130. Xu Z, Karlsson J, Huang Z (2015) Modeling the Dynamics of Acute Phase Protein Expression in Human Hepatoma Cells Stimulated by IL-6. *Processes* 3:50–70
131. Yang A, Mottillo EP, Mladenovic-Lucas L, Zhou L, Granneman JG Dynamic interactions of ABHD5 with PNPLA3 regulate triacylglycerol metabolism in brown adipocytes. *Nat Metab*
132. Yang L, Arora K, Beard WA, Wilson SH, Schlick T (2004) Critical Role of Magnesium Ions in DNA Polymerase 's Closing and Active Site Assembly.
133. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F Cell Metabolism Review FAT SIGNALS-Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling.
134. Zhang C, Shi L, Wang FS (2020) Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:428–430
135. Zhao J, Yang Y, Huang H, Li D, Gu D, Lu X, Zhang Z, Liu L, Liu T, Liu Y, He Y, Sun B, Wei M, Yang G, Wang X, Zhang L, Zhou X, Xing M, Wang PG Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility.
136. Zhou YJ, Zheng KI, Wang XB, Sun QF, Pan KH, Wang TY, Ma HL, Chen YP, George J, Zheng MH (2020) Metabolic-associated fatty liver disease is associated with severity of COVID-19. *Liver Int* 40:2160–2163
137. Zinellu A, Arru F, De Vito A, Sassu A, Valdes G, Scano V, Zinellu E, Perra R, Madeddu G, Carru C, Pirina P, Mangoni AA, Babudieri S, Fois AG (2020) The De Ritis ratio as prognostic biomarker of in-hospital mortality in COVID-19 patients. *Eur J Clin Invest*
138. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. URL: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>
139. Situation Report-51 SITUATION IN NUMBERS total and new cases in last 24 hours.
140. RKI - Navigation - Epidemiologie (Stand: 7.8.2020). URL: [https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/NCOV2019/FAQ\\_Liste\\_Epidemiologie.html#FAQId13985854](https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/NCOV2019/FAQ_Liste_Epidemiologie.html#FAQId13985854)
141. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. URL:

- [https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAjw2dD7BRASEiwAWCtCbwMyQlhdqEsxCcd5U0jUfLuxy4uRlw\\_wjgLcKBZdzP\\_Y\\_2YeZRNALRoC73EQAvD\\_BwE](https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAjw2dD7BRASEiwAWCtCbwMyQlhdqEsxCcd5U0jUfLuxy4uRlw_wjgLcKBZdzP_Y_2YeZRNALRoC73EQAvD_BwE)
142. RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19). URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Steckbrief.html#doc13776792bodyText2](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html#doc13776792bodyText2)
143. Certain Medical Conditions and Risk for Severe COVID-19 Illness | CDC. URL: [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fneed-extra-precautions%2Fgroups-at-higher-risk.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fneed-extra-precautions%2Fgroups-at-higher-risk.html)
144. Symptoms of Coronavirus | CDC. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
145. Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) - DGIM Innere Medizin - eMedpedia. URL: [https://www.springermedizin.de/emedpedia/dgim-innere-medizin/nichtalkoholische-fettlebererkrankung-nafld?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-54676-1\\_153](https://www.springermedizin.de/emedpedia/dgim-innere-medizin/nichtalkoholische-fettlebererkrankung-nafld?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-54676-1_153)
146. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet] - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176/>
147. BfArM - Weitere Arzneimittelrisiken - Hydroxychloroquin: Risiko für schwerwiegende Nebenwirkungen bei Anwendung zur Behandlung von COVID-19. URL: <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RI/2020/RI-hydroxychloroquin.html>
148. Indexed in EMBASE/Compendex, Geobase and Scopus [www.kup.at/gastroenterologie](http://www.kup.at/gastroenterologie). URL: [www.kup.at/gastroenterologie](http://www.kup.at/gastroenterologie)
149. Blutgruppen & Verteilung in der Bevölkerung – Über die Blutspende beim DRK. URL: <https://www.drk-blutspende.de/spenderservices/blutgruppen-und-verteilung-in-der-bevoelkerung.php>
150. (1968) Virology: Coronaviruses. Nature 220:650
151. (2010) NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. URL: [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
152. (2015) WHO | Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO

## 7 Publikationen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Antonia Machill, Robert Bals, Frank Lammert, Marcin Krawczyk  
“Genetic insight into COVID-19 related liver injury: a note on *MBOAT7*”  
Liver Int. 2021 May;41(5):1157-1159. doi: 10.1111/liv.14732. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33202092; PMCID: PMC7753702.
- Piero Portincasa, Marcin Krawczyk, Antonia Machill, Frank Lammert, Agostino Di Ciaula  
“Hepatic consequences of COVID-19 infection. Lapping or biting?”  
Eur J Intern Med. 2020 Jul;77:18-24. doi: 10.1016/j.ejim.2020.05.035. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32507608; PMCID: PMC7262543.

### **8 Danksagung**

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Frank Lammert für die Überlassung des Themas und für seine ausgezeichnete und außergewöhnlich lehrreiche Betreuung. Dank seiner stetigen Bereitschaft zu Anregungen, hilfreichen Ideen und konstruktiver Kritik sowie Dank seiner flexiblen Bereitstellung der notwendigen Ressourcen wurde diese Arbeit erst ermöglicht.

Bei Dr. rer. nat. Susanne Weber und der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft, die mir viel theoretische und praktische Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit der Arbeit zuteilwerden ließ. Vor allem möchte ich hier Frau Irina Nowak und Frau Friederike Berghaus für die ausführliche und freundliche Einarbeitung in die Genotypisierung danken.

Außerdem richte ich Herrn Professor Dr. med. Marcin Krawczyk meinen Dank aus, der mich im Umgang mit wissenschaftlichen Veröffentlichungen unterstützt und mir mit neuem Blickwinkel wertvolle Tipps zur Auswertung der Ergebnisse gegeben hat.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil für die eingehende biometrische Beratung und ihre Ratschläge zur statistischen Analyse.

Danken möchte ich zudem Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Bals für die Bereitstellung der Patientendaten und Proben für molekulargenetische Untersuchungen. Ebenso spreche ich Herrn Dr. med. Kaddu-Mulindwa, Frau Professorin Dr. med. Wilkens und Herrn Professor Dr. med. Grandt meinen Dank aus.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.