

Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Friess)

## **Funktionelle Analyse von TCAB1-Mutationen bei chronischen Lebererkrankungen**

**Daniela Klein-Kronbeck**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Zahnheilkunde (Dr. med. dent.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: **Prof. Dr. Ernst J. Rummeny**  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Gürdalp O. Ceyhan  
2. Prof. Dr. Dr. Klaus Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 27.05.2016 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.12.2016 angenommen.

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Telomere .....	6
1.2	Telomerase .....	8
1.3	End-Replication Problem .....	10
1.4	TCAB1 .....	11
1.5	Erkrankungen bei Funktionsstörungen der Telomerase .....	13
1.5.1	Dyskeratosis Congenita .....	14
1.5.2	Aplastische Anämie .....	14
1.5.3	Idiopathische Lungenfibrose .....	15
1.6	Leberzirrhose .....	16
1.6.1	Pathogenese .....	16
1.6.2	Ätiologie .....	17
1.7	Hepatitis C Virus .....	19
1.8	Alkoholabusus .....	20
1.9	Ziele der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1	Materialien .....	22
2.1.1	Reagenzien .....	22
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3	Laboraausstattung .....	23
2.2	Methoden .....	24
2.2.1	Probenauswahl .....	24
2.2.2	PCR .....	24

---

2.2.3	Gelelektrophorese .....	26
2.2.4	Sequenzierung .....	27
2.2.5	Sequenzanalyse .....	27
2.3	Statistische Analyse .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1	Demographische Verteilung der Studiengruppen .....	31
3.2	Auswertung der Mutationsanalyse .....	32
3.2.1	Studiengruppe Alkohol-induzierte Leberzirrhose .....	32
3.2.2	Studiengruppe Hepatitis-C-Virus-induzierte Leberzirrhose .....	38
3.2.3	Kontrollgruppe .....	39
3.3	Kein signifikant erhöhtes Vorkommen von TCAB1 Mutationen in den Studiengruppen .....	40
3.4	Korrelation klinischer Daten mit dem Auftreten von homozygoten TCAB1-Einzelnukleotidpolymorphismen der EtOH-Gruppe .....	41
3.5	Identifizierung einer neuen heterozygoten Mutation in der HCV-Studiengruppe .....	46
3.6	Mutation c.663G>A p.V221V ist assoziiert mit Progress HCV-induzierter Leberzirrhose .....	47
3.7	Einzelnukleotidpolymorphismus c.936C>T p.C312C ist assoziiert mit Progress Alkohol-induzierter Leberzirrhose .....	48
3.8	Signifikant erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Einzelnukleotidpolymorphismen bei afrikanischen Patienten mit Alkohol-induzierter Leberzirrhose .....	48
3.9	Erhöhtes Vorkommen von Einzelnukleotidpolymorphismen bei dunkelhäutigen Patienten .....	51
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>53</b>
4.1	Auswertung Mutationsanalyse .....	53

---

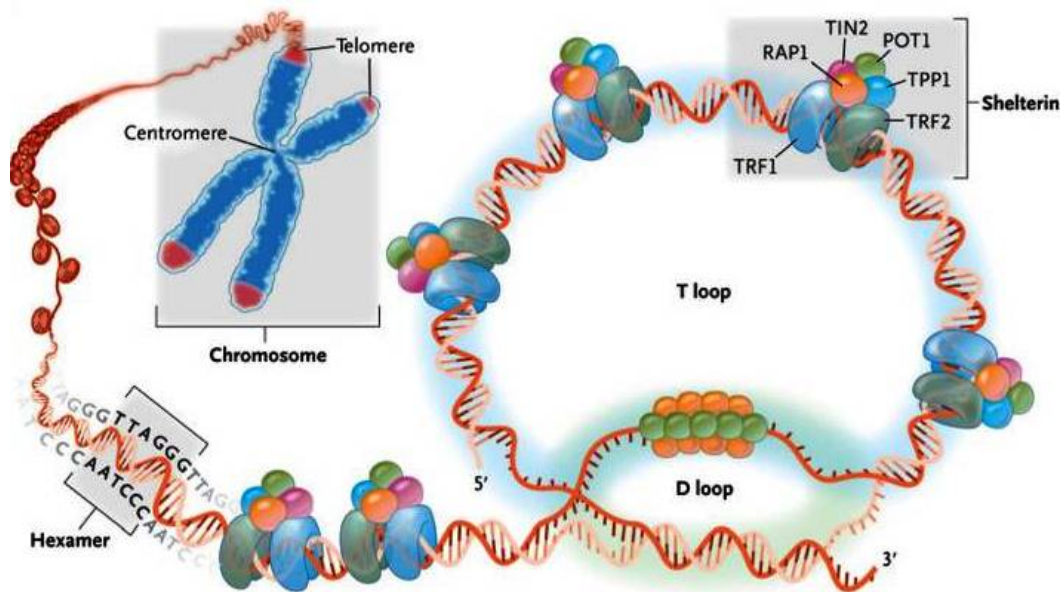
4.2	Korrelation klinischer Daten innerhalb der Gruppe Alkohol- induzierter Leberzirrhosen mit dem Auftreten homozygoter SNP .....	55
4.3	Einzelnukleotidvariante 663G>A in der Gruppe der HCV-induzierten ist assoziiert mit dem Progress einer Leberzirrhose .....	57
4.4	Polymorphismen in Abhängigkeit von der Ethnizität .....	58
4.5	Ausblick .....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>71</b>

---

## **1 Einleitung**

### 1.1 Telomere

Als Telomere bezeichnet man die repetitive DNA-Sequenz, die sich am Ende eines jeden Chromosoms einer eukaryotischen Zelle befindet [1-4]. Bei der menschlichen DNA lautet diese Sequenz 5'-TTTAGGG-3' [5-7]. Dreidimensionale, lasso-artige Strukturen (sogenannte T-Loops) [8] überdecken die Enden der Telomere und verhindern, dass diese als Doppelstrangbrüche erkannt werden und in der Folge ein DNA-Reparaturmechanismus in Gang gesetzt wird [4]. Bindende Proteine, die als Shelterin-Komplex bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der T-Loops [9]. Dieser Komplex verhindert, dass die Chromosomenenden als DNA-Brüche erkannt werden und entsprechende DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst werden [10]: Die sechs Proteine TRF1 und TRF2 (Terminal Restriction Fragments), POT1 (Protection of Telomeres 1), TIN2 (TRF1-interacting Nuclear Factor 2), RAP1 (Repressor Activator Enzym 1) und TPP1 bilden den Shelterin-Komplex, welcher eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Stabilität und Funktion der Telomere spielt [10-15]. In Abbildung 1 wird die Struktur der Telomere mit dem Shelterin-Komplex genauer dargestellt.



**Abbildung 1:** Struktur der Telomere. Die Telomere befinden sich am Ende der Chromosomen [2]. Es handelt sich um Hexamere repetitiver DNA-Sequenzen [4, 5]. Der Shelterin-Proteinkomplex dient dem Schutz der Telomere. Das 3'Ende des Telomerstrangs bildet einen Einzelstrangüberhang, der durch Faltung zusammen mit der Doppelstrang-Telomerhelix einen sogenannten T-Loop bildet [4]. Abbildung nach Calado et al [4].

Telomere verhindern die End-zu-End-Fusion der Chromosomen [1, 16] und sind somit außerordentlich wichtig für die Erhaltung der Stabilität eines Chromosoms [1, 3-5, 16, 17].

Im weiteren Verlauf kommt es in den meisten menschlichen Zellen zu einer Verkürzung der Telomerlänge [5, 16, 18], was die Zellteilungsrate einer somatischen menschlichen Zelle auf fünfzig bis siebzig Zyklen limitiert [17, 19, 20]. Bei zunehmender Verkürzung der Telomere kommt es zur Einleitung eines p53- und Rb (retinoblastoma Protein)-abhängigen Tumor-Supressor-Signalwegs [21-23]. Die Folge ist ein Stillstand der Zellteilung, die Seneszenz [24]. Durch eine Inaktivierung von p53 und Rb wird p21 unterdrückt und es kommt somit zu einer Verlängerung der möglichen Zellreplikationen. Eine Seneszenz wird damit verhindert und endet möglicherweise in der sogenannten „Crisis“, ein Zustand massiven Zelltods und genetischer Instabilität [21, 24].

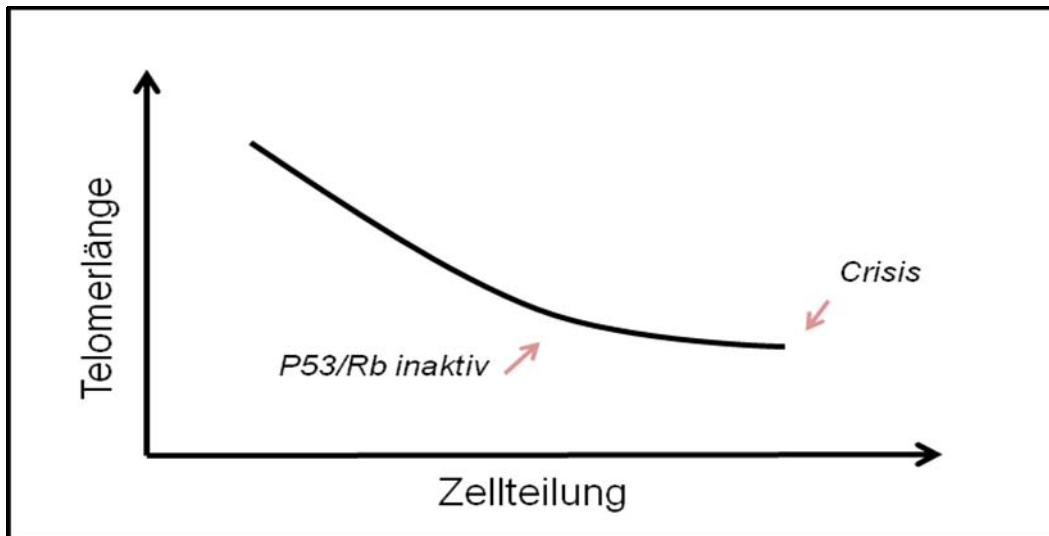


Abbildung 2: Telomerlänge in Abhängigkeit von der Zellteilung in Abhängigkeit von p53 und Rb. Mit zunehmender Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomerlänge. Die Inaktivierung von p53 und Rb führt dazu, dass die Zelle in den Zustand der „Crisis“ übergeht, (nach [4, 20, 21, 23-26]).

## 1.2 Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonukleoenzymkomplex [27, 28] und hat die Aufgabe, die Verkürzung der Telomere durch Synthese und Anhängen von 5'-TTAGGG-3'-Sequenzen an deren 3'-Ende zu kompensieren [9, 20, 25, 26, 29].

Das Holoenzym Telomerase besteht aus zwei Hauptuntereinheiten: einer RNA Komponente (Telomerase RNA Component; TERC) und einer Telomerase reverse Transkriptase (TERT) [9]. Darüber hinaus besteht der Komplex aus weiteren eingelagerten Proteinkomponenten: Dyskerin, welches TERC bindet [30], NHP2 (non-histone protein 2), NOP10 (Nucleolar protein 10), GAR1 (glycine and arginine rich domain 1), Pontin/Reptin und TCAB1 (Telomerase Cajal Body Protein1). TERC dient TERT als RNA Matrize bei der Telomersynthese [4]. Die ATPasen Pontin und Reptin interagieren mit Dyskerin und TERC zu einem Komplex; dieser Komplex aktiviert und stabilisiert TERT [31-33]. Pontin und Reptin dissoziieren anschließend von dem TERT-TERC-Dyskerin-Komplex, welcher das aktive Telomerase-Enzym bildet [27, 33].



Die vier RNA-bindenden Proteine Dyskerin, NHP2, NOP10 und GAR1 binden an ein H/ACA Motiv [32], ein spezielles Erkennungsmotiv für nicht-kodierende RNAs [30], und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Anordnung der Telomerase [32].

Telomerase ist in menschlichen Zellen hauptsächlich während der Embryogenese aktiv [23]. Danach findet man Telomeraseaktivität lediglich in Zellen der Keimbahn [34], in Stammzellen [34] und in stimulierten Lymphozyten [21, 35-38].

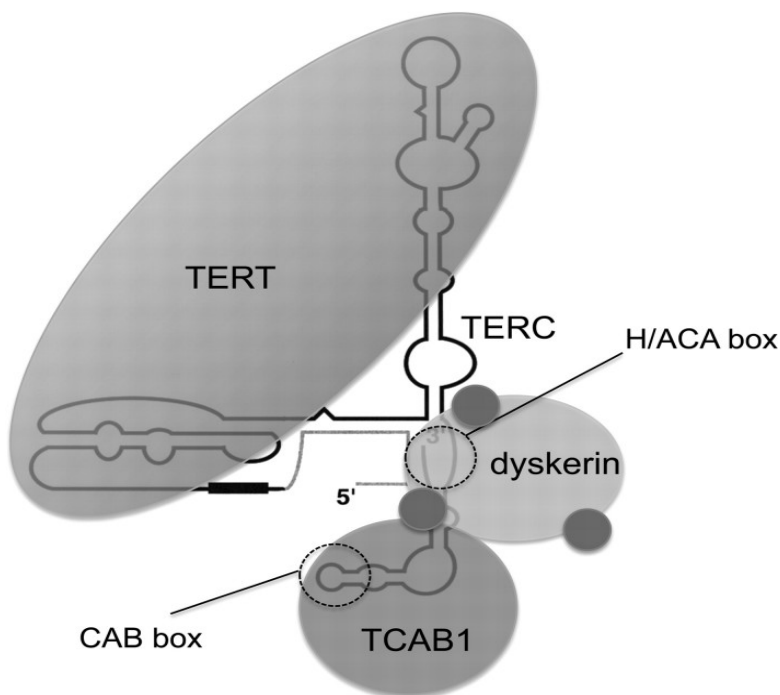


Abbildung 3: Aufbau der Telomerase, bestehend aus TERT, TERC und Dyskerin mit der Untereinheit TCAB1 [39]. Die H/ACA Box fungiert als Bindungsstelle für Dyskerin. Die kleinen dunkelgrauen Kreise sind die mit Dyskerin assoziierten, an ein H/ACA-Motiv bindenden Proteine NHP2, NOP10 und GAR1 [32, 39]. Abbildung nach Artandi et al [39].

Zahlreiche Studien haben zeigen können, dass eine Aktivierung der Telomerase in humanen Zellen zu einer Stabilisierung der Telomerlänge führt und somit ein Eintreten in die Phase der Seneszenz verhindert [5]. Durch diese Stabilisierung wird das proliferative Potential der Stammzellen, Progenitorzellen und Tumorzellen aufrecht erhalten [30].

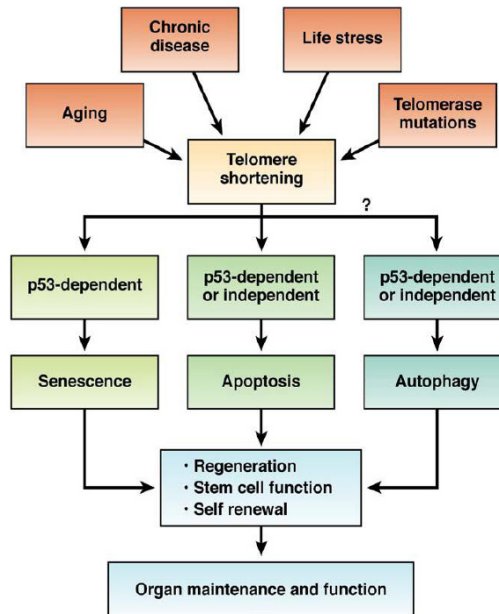
In gesunden humanen Leberproben konnte keine signifikante Telomeraseaktivität nachgewiesen werden [40, 41]. Im Gegensatz dazu konnte in Fällen chronischer viraler Hepatitis oder Zirrhose Telomeraseaktivität detektiert werden [42-44]. Zudem konnten einige Studien zeigen, dass es im Rahmen der Leberzirrhose zur Verkürzung von Telomeren kommt. Dieser Umstand lässt vermuten, dass die Telomerverkürzung bei der Entstehung der Leberzirrhose eine verminderte Regenerationsfähigkeit und beschleunigte Fibroseentwicklung bedingt [5, 23, 45, 46]. In diesem Zusammenhang konnten verkürzte Telomere in Hepatozyten, jedoch nicht in Stellatum-Zellen oder Lymphozyten nachgewiesen werden [46]. Diese Daten unterstützen die Telomerhypothese bei der Zirrhoseentwicklung. Demnach kommt es bei chronischen Erkrankungen der Leber zu einer Schädigung der Hepatozyten, gefolgt von Regeneration und einem damit erhöhtem Zellumsatz verbleibender Hepatozyten. Telomerverkürzung und die Einleitung einer Seneszenz sind die Folge [9].

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass verkürzte Telomere eine bedeutende Rolle bei der Karzinogenese spielen [4, 9, 23, 47].

### 1.3 End-Replication Problem

Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere um etwa 50-100 Basenpaare [9]. Da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, das Ende der linearen DNA vollständig während der S-Phase (Synthesephase) eines Zellzyklus zu verlängern [48], kommt es zu dem sogenannten „end replication problem“ [4, 5, 31]: Die DNA-Polymerase benötigt zum Starten der DNA-Replikation einen 5' RNA-Primer [49]. Der Primer spaltet sich dann ab während die Polymerase den Matrizenstrang entlang läuft; dabei entsteht eine Lücke am Ende des Chromosoms [4, 49, 50]. Die Enden können demnach nicht komplett repliziert werden und der neu synthetisierte Strang ist kürzer als die Matrize [4].

Zu kurze Telomere können die Enden der Chromosomen nicht mehr überdecken und es wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur replikativen Seneszenz führt [5, 18, 19, 21, 51].



**Abbildung 4:** Die Rolle der Telomere bei der Regeneration und Erhaltung eines Organs. Alterung, chronische Erkrankungen, Stress und Mutationen der Telomerase führen zu einer Verkürzung der Telomere. Es folgen verschiedene Signalwege, die eine Seneszenz, Apoptose oder Autophagie zur Folge haben können. Mit Genehmigung von Opitz et al [5].

#### 1.4 TCAB1

TCAB1, auch WD79 oder WRAP53 (WD40-encoding RNA antisense to p53) genannt (genetische ID 55145), ist eine Untereinheit des aktiven Telomerase-Holoenzym Proteins. Es vermittelt den Transport der Telomerase zu den Cajal Bodies, dem Ort der RNA- und Ribonukleoproteinverarbeitung [52-54], und ermöglicht auf diese Weise die Synthese der Telomerase [27, 30, 55, 56]. Das Gen *TCAB1* liegt auf Chromosom 17p13 und überlappt teilweise das Tumorsuppressorgen *p53*. Das Protein besteht aus 548 Aminosäuren und hat eine Masse von 75kDa [57].

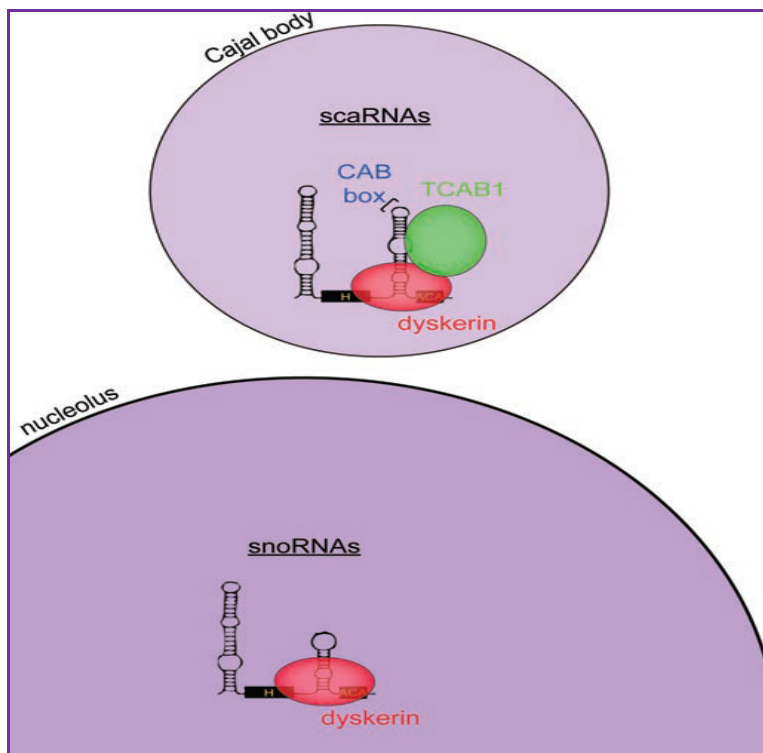
TERC nimmt an seinem 3'-Ende das H/ACA-Box Motiv auf [58]. H/ACA Ribonukleoproteine (RNPs), wie die Telomerase, katalysieren meist die Umwandlung von Uridinresten in ribosomale und spliceosomale RNA [30, 59]. RNAs, die an der ribosomalen Umwandlung beteiligt sind, wandern zu den Nukleoli und werden daher small nucleolar RNAs (snoRNAs) genannt [30, 56]. RNAs, die an der spliceosomalen Umwandlung beteiligt sind, wandern zu den Cajal Bodies und man nennt sie small Cajal Body RNA (scaRNAs) [30]. Im Gegensatz zu den snoRNAs besitzen scaRNAs

---

zusätzlich eine Cajal Body Box (CAB Box), ein RNA Element [56], welches zur Auffindung der Cajal Bodies notwendig ist [56, 60]. TERC, zum Beispiel, ist eine scaRNA, denn es enthält sowohl H/ACA- als auch CAB-Box-Sequenzen [30] (siehe Abbildung 5).

Venteicher und Kollegen beschrieben im Jahre 2009 das Protein TCAB1, welches sie bei der Erforschung von mit Dyskerin interagierenden Proteinen identifizieren konnten [30]. TCAB1 erkennt die CAB-Box in TERC und interagiert mit Dyskerin [27, 39]. Es verbindet sich mit dem aktiven Telomerase-Komplex und transportiert ihn durch die Cajal Bodies zu den Telomeren [27]. TCAB1 ist also der H/ACA-abhängige CAB-Box-Bindungsfaktor, der den Transport der scaRNA zu den Cajal Bodies vermittelt [30, 56]. Genauere Mechanismen, wie TCAB1 die Rekrutierung der Telomerase zu den Telomeren durchführt, und welche Rolle die CAB-Box dabei spielt, sind noch ungeklärt [61]. Mutationen der CAB-Box führen zu Fehlverteilungen und zu Einschränkungen bei der Telomerverlängerung [56].

TCAB1-Transkripte können in das WRAP53-Protein umgeschrieben werden, welches zur WD40-Proteinfamilie gehört [57]. Dieses Protein ist wichtig für zahlreiche Prozesse, wie Apoptose, Zellzyklusregulationen und RNA-Metabolismus [57]. Ein Knockdown dieses Proteins hat massive Apoptose zur Folge, während eine Überexpression verstärkte Zellproliferation induzieren kann [57]. TCAB1 spielt eine wichtige Rolle bei der Telomersynthese [27] und der Pathogenese humaner Krebszellen [57].



**Abbildung 5:** SnoRNAs und scaRNAs. Sie unterscheiden sich durch ihre Motivsequenzen und ihre Lokalisation. SnoRNAs wandern in den Nucleolus, scaRNAs wandern, gesteuert von der CAB Box, zu den Cajal Bodies. Dyskerin heftet sich an das H/ACA Motiv. TCAB1 assoziiert mit Dyskerin und verbindet sich mit scaRNAs. TCAB1 wird für den Transport von TERC zu den Cajal Bodies benötigt. Mit freundlicher Genehmigung von Artandi et al [30].

### 1.5 Erkrankungen bei Funktionsstörungen der Telomerase

Hartmann und Kollegen zeigten erstmals, dass das Auftreten von Telomerase-Mutationen mit dem Progress der Leberzirrhose bei chronischen Lebererkrankungen in Zusammenhang stehen kann [17]. Ihnen gelang es, verschiedene Mutationen in TERC und TERT bei Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie zu identifizieren [17].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Telomere zu einer fibrotischen Umwandlung des Gewebes führt [4]. Genetische Studien belegten darüber hinaus, dass Telomerase-Mutationen als Ursache für beschleunigte Telomerverkürzung und Organversagen bei einigen Erkrankungen, z.B. Formen von Dyskeratosis Congenita [62], Knochenmarksversagen, aplastischer Anämie oder idiopathischer Lungenfibrose, zugrunde liegen können [17, 18, 63, 64].

---

### 1.5.1 *Dyskeratosis Congenita*

Dyskeratosis Congenita (DC), eine Form der ektodermalen Dysplasie [4], ist eine genetische Erkrankung verursacht durch verkürzte Telomere und gestörte Stammzellfunktion [55]. Symptomatisch stellt sich eine klassische Triade von kutanen Merkmalen dar: Orale Leukoplakien, abnorme Hautpigmentierung und Nageldystrophie [4, 55]. Neben diesen mukokutanen Symptomen ist eine somatische Beteiligung ebenfalls möglich [4], wie beispielsweise Knochenmarksversagen [65] oder eine Krebserkrankung [66]. Die häufigste Todesursache bei Patienten mit DC ist Knochenmarksversagen bei aplastischer Anämie [63]. 20 % der Patienten entwickeln zudem eine Lungenfibrose, welches die zweithäufigste Todesursache darstellt [63, 67].

Mutationen des Gens *DKC1* (Dyskeratosis Congenita 1), welches für das Protein Dyskerin kodiert [62], konnten in Patienten mit DC identifiziert werden [4, 68, 69]. Dyskerin bindet an TERC und beeinflusst zahlreiche Zellabläufe [4]. Weitere Mutationen fand man in den Genen *TERC* [70], *NOP10* [71] und *NHP2* [72], welche für Proteine kodieren, die mit dem Telomerase-Komplex in Zusammenhang stehen [4] sowie in TERT. Im Vergleich zu gesunden Individuen stellte man signifikant verkürzte Telomere und eine verringerte Telomeraseaktivität bei an DC erkrankten Patienten fest [62, 73]. Einige Formen der DC können somit als das Ergebnis einer fehlerhaften Reparatur oder eines mangelnden Schutzes der Telomere angesehen werden [4].

Neueste Studien zeigen einen Zusammenhang von TCAB1-Mutationen und Patienten mit autosomal rezessiver DC [55]. In dieser Studie identifizierten Zhong et al. Missense-Mutationen in TCAB1 bei DC-Patienten und stellen die Hypothese auf, dass Mutationen, die die Funktion von TCAB1 beeinträchtigen auch bei der Entstehung anderer Erkrankungen mitwirken [55].

### 1.5.2 *Aplastische Anämie*

Hämatopoetische Fehlfunktionen durch fehlerhafte Telomerstrukturen und Reparaturmechanismen haben ein breites klinisches Spektrum [4]. Bei der aplastischen Anämie enthält das Knochenmark nur sehr wenige hämatopoetische

---

Stammzellen und besteht hauptsächlich aus Fett [74, 75]. Der erhöhte Verlust der primitiven Progenitorstammzellen wird durch die Rekrutierung reifer Vorläuferzellen und deren häufigere Zellteilung teilweise kompensiert, was zu erhöhtem replikativen Stress und beschleunigter Telomerverkürzung führt. [74]. Viele Patienten, die an einem erblichen oder erworbenen Knochenmarksversagen leiden, haben verkürzte Telomere [74, 76, 77] und weisen Telomerase-Mutationen auf, darunter verschiedene TERC- und TERT-Varianten [4, 15, 65, 75, 78]. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit erworbener aplastischer Anämie konnten in Leukozyten verkürzte Telomere nachgewiesen werden [75]. Es wird außerdem vermutet, dass der Ausfall der Telomeraseaktivität die Regeneration der Stammzellen des Knochenmarks limitiert [75, 78].

### *1.5.3 idiopathische Lungenfibrose*

Die idiopathische Lungenfibrose (ideopathic pulmonary fibrosis, IPF), auch kryptogenetische fibrosierende Alveolitis genannt [79], ist eine tödliche Lungenerkrankung im Erwachsenenalter unbekannter Ätiologie, die mit narbigen Veränderungen des Gewebes einhergeht und in der Regel ab dem fünfzigsten Lebensjahr auftritt [80]. Die typischen Symptome einer Lungenfibrose sind Husten, Dyspnoe, gestörter Gasaustausch und reduziertes Lungenvolumen [4]. Es konnte festgestellt werden, dass in manchen Fällen eine familiäre Häufung der idiopathischen Lungenfibrose auftritt, sodass man von einer familiären IPF sprechen kann [63, 81, 82]. Im Gegensatz zu anderen interstitiellen Lungenerkrankungen spricht die IPF nicht auf eine Therapie mit Immunsuppressiva an. Die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt in etwa drei bis sechs Jahre [80, 81]. Bei ca. 15 % der Patienten mit IPF konnten Mutationen der Telomerase nachgewiesen werden [4]. Diese Mutationen betrafen TERC und TERT bei Patienten mit einer familiären IPF [80]. Zudem wiesen Patienten mit diesen Mutationen verkürzte Telomere auf [63].

---

## 1.6 Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist ein fortgeschrittenes, irreversibles Stadium der Leberfibrose [83-85] und entsteht meist infolge einer langjährigen chronischen Lebererkrankung [5, 17, 86]. Fibrose ist definiert als ein Umbau von geschädigtem Gewebe in fibröses Narbengewebe [17, 85, 87]. Leberzirrhose wird definiert als histologische Umwandlung des Lebergewebes in regenerative Knötchen und Bindegewebsfasern als Folge chronischer Leberschädigung [85, 86]. Die histologische Einteilung der Zirrhose erfolgt anhand der Größe dieser Knötchen, wobei bei der mikronodulären Zirrhose die Knötchen einen Durchmesser unter drei Millimeter aufweisen, während bei der makronodulären Zirrhose die Knötchen einen Durchmesser größer drei Millimeter einnehmen; Mischformen können auftreten [83, 88].

### *1.6.1 Pathogenese*

Die Leberzirrhose geht einher mit einer Veränderung der hepatischen Blutgefäße [86], dies führt zu einem Shunt der portalen und arteriellen Blutversorgung, was den Austausch zwischen Lebersinusoiden und Parenchym verhindert [85]. Bei einer Leberzirrhose ist der Disse-Raum mit Narbengewebe ausgekleidet und es kommt zu einem Verlust der Fenestration der Endothelzellen [83, 85].

Ein Fortschreiten der Fibrose bzw. der Zirrhose führt zu Leberfunktionsstörungen, portaler Hypertension sowie möglicherweise zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms [83, 85, 89, 90]. Nach Manifestation eines Leberversagens liegt die Sterblichkeitsrate der Patienten ohne Transplantation bei 85% innerhalb von fünf Jahren [85, 91].

Die Pathogenese der Leberzirrhose gilt als äußerst komplexer Vorgang, bei dem die Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind [92]. Zusätzlich spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Zirrhose [85, 88].

Eine wichtige Hypothese zur Pathogenese der Leberzirrhose ist die Telomerhypothese (siehe Abbildung 6) [46]. Chronische Schädigung der Hepatozyten und ihre ständige Erneuerung führen zu einer schnelleren Verkürzung der Telomere. Die Hepatozyten erreichen das Stadium der Seneszenz, die



Regenerationsfähigkeit der Leber nimmt ab und andere Zellen, wie Stellatum-Zellen, werden aktiviert und bilden ein narbiges Ersatzgewebe [46, 93].

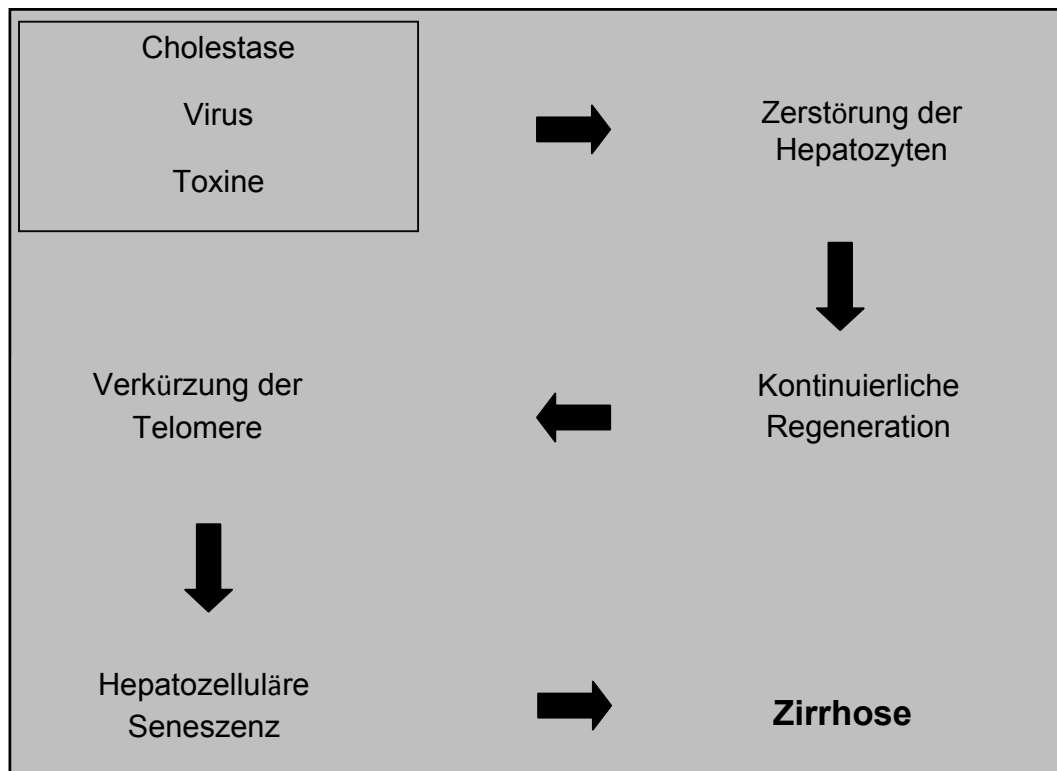


Abbildung 6: Telomerhypothese der Zirrhose. Andauernde Leberschädigung und gleichzeitige Reparatur führen zu einer schnelleren Telomerverkürzung. Es kommt zur Hepatozellulären Seneszenz und die Regeneration der Leber kommt zum Erliegen. Die Folge ist eine fibrotische Veränderung des Gewebes [46]. Abbildung nach [46].

### 1.6.2 Ätiologie

Die Prävalenz der Leberzirrhose in Deutschland nimmt deutlich zu; sie zählt inzwischen zu den zwanzig häufigsten Todesursachen in Deutschland [88].

Eine Leberzirrhose kann als Folge von exogen/toxischen, infektiösen, toxisch/allergischen, immunpathologischen/autoimmunen oder vaskulären Prozessen bzw. angeborenen Stoffwechselstörungen entstehen [88], in etwa 5% der Fällen liegt

eine idiopathische Zirrhose vor [94]. Als häufigste Ursachen für die Entstehung einer der Leberzirrhose in Deutschland gelten die äthyltoxische und nicht-äthyltoxische Fettleber sowie die virale Hepatitis (B oder C) [88], vgl. Tabelle 1.

Tabelle 1: Ursachen der Leberzirrhose (nach [88]).

<b>Ätiologie</b>	<b>Beispiele</b>
<b>Viral</b>	Hepatitis B, C
<b>Autoimmun</b>	Autoimmune Hepatitis, primäre biliäre Zirrhose
<b>Chronisch biliär</b>	Gallengangstenose, rezidivierende bakterielle Cholangitis
<b>Vaskulär</b>	Budd-Chiari-Syndrom, Rechtsherzinsuffizienz
<b>Fettleber</b>	Äthyltoxische Fettleber, NASH
<b>Speicherkrankheiten</b>	Morbus Wilson, Hämochromatose
<b>Seltenere Ursachen</b>	Medikamentös, Porphyrrie

Die Kenntnis über die Ursache der Zirrhose ist von großer Bedeutung, da sie für die Auswahl der Therapie ausschlaggebend ist und die Vorhersage potentieller Komplikationen ermöglicht [85]. So konnten in epidemiologischen Studien Risikofaktoren identifiziert werden, die eine Entstehung der Leberzirrhose bei bekannter Vorerkrankung begünstigen [85]. Zu diesen Risikofaktoren gehören unter anderem Übergewicht, Hypertonie, Hyperlipidämie und regelmäßiger Alkoholkonsum. Ca. 5% der betroffenen Patienten weisen jedoch keine der genannten Risikofaktoren auf [92].

Häufig erfolgt die Diagnosestellung rein zufällig im Rahmen von Routineuntersuchungen, da die Patienten oftmals nur unspezifische Symptome

---

zeigen [83]. Die spezifischen Symptome bei einer Lebererkrankung sind von denen einer chronischen Erkrankung zu unterscheiden [83].

### 1.7 Hepatitis C Virus

Hepatitis C ist eine Infektionskrankheit der Leber, die durch das Hepatitis C Virus (HCV) hervorgerufen wird [87]. In erster Linie wird das Virus über Blutkontakt mit einer infizierten Person übertragen, ein erhöhtes Risiko haben somit z.B. i.v. Drogenabhängige, im Gesundheitswesen tätige Personen sowie Neugeborene HCV-infizierter Mütter [87, 95]. In Deutschland leiden ca. 0,5% der Bevölkerung an einer chronischen Hepatitis C-Infektion [88]. Etwa 20% der HCV-Patienten entwickeln eine Leberzirrhose [85], wobei man bei der Mehrheit der Patienten von einer Latenzphase von etwa zehn bis fünfzehn Jahren ausgehen kann [86]. Risikofaktoren, die den Verlauf der HCV-Infektion beschleunigen können, sind höheres Alter zum Infektionszeitpunkt, männliches Geschlecht, Übergewicht, Fettleber und exzessiver Alkoholenuss [96]. In der westlichen Welt ist die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation bei Erwachsenen eine Leberzirrhose aufgrund einer chronischen HCV-Infektion [97].

Der Pathomechanismus der Fibrose bei chronischer viraler Hepatitis beruht auf der periportal Entzündung [83]. Zudem konnten *in vitro* Studien belegen, dass das Hepatitis-C-Virus direkt fibrogen wirkt und virale HCV-Proteine die Apoptose regulieren [89, 98]. Das Virus an sich ist nicht zytotoxisch; die Leberschädigung wird ausgelöst durch die Immunantwort des Wirts auf Hepatozyten, die die viralen Proteine exprimieren [89].

### 1.8 Alkoholabusus

In den westlichen Ländern ist chronischer Alkoholmissbrauch die häufigste Ursache der Leberzirrhose [99]. Das Ausmaß an Leberschädigung, die durch Alkohol verursacht wird, variiert von alkoholischer Fettleber über Alkohol-induzierte Fettleber

---

bis hin zu Leberfibrose und Leberzirrhose[100]. Die Alkohol-induzierte Leberzirrhose ist die zweithäufigste Ursache für eine Lebertransplantation [97].

Eine Dekompensation der Leberfunktion bei ethyltoxischer Leberzirrhose bei anhaltendem Alkoholkonsum weist einen schnelleren Verlauf auf, als bei HCV- oder HBV-bedingter Leberzirrhose [85].

Ethanol führt zu charakteristischen funktionellen Veränderungen der Mitochondrien und Mikrosomen [101, 102], zu oxidativem Stress [103, 104] sowie zur Freisetzung von Zytocrom C [105], einer Aktivierung der Caspase [104] und der Kupffer-Zellen, welche Entzündungsmediatoren, wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), Interleukin 6 und TGF  $\beta$ 1 (Transforming growth factor; transformierender Wachstumsfaktor), ausschütten [106]. Hepatozelluläre Apoptose [101] und Entzündungsreaktionen sind dabei die Folge [89, 104].

Die Schädigung der Zelle findet hauptsächlich perizentral statt [83], jedoch sind die genaueren Umstände, unter welchen die Individuen einen Leberschäden oder eine Fibrose entwickeln, noch nicht vollständig geklärt [89, 106].

### 1.9 Ziele der Arbeit

Telomere sind entscheidend für die Stabilität eines Chromosoms und damit auch für die somatische Zelle [1, 2]. Die Telomerase sorgt für die Stabilität der Telomere und erhält das proliferative Potential einer Zelle aufrecht [9, 20]. TCAB1, eine Untereinheit der Telomerase, spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese der Telomerase [27, 30, 55]. Funktionsstörungen der Telomerase, wie beispielsweise Mutationen von TCAB1 oder anderen Untereinheiten können zu einem Progress einer Leberzirrhose oder zu Erkrankungen mit fibrotischer Umwandlung des Gewebes führen [4, 17, 18, 62, 63]. Eine Verkürzung der Telomere limitiert die Regenerationsfähigkeit der Leberzellen bei chronischen Lebererkrankungen [107-109]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Auftreten von Telomerase-Mutationen mit dem Progress einer Zirrhose bei chronischer Lebererkrankung assoziiert ist. Darüber hinaus wurden im Zusammenhang mit Dyskeratosis Congenita TCAB1-Mutationen identifiziert [27, 55].

Lange Zeit war nicht bekannt, warum es bei Patienten mit ähnlichen Risikofaktoren zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen kommt, sodass hier zusätzlich eine genetische Prädisposition vermutet wird [85, 88].

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen möchten wir in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Analyse von *TCAB1* bei Patienten mit progredienter Leberzirrhose durchführen und ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *TCAB1*-Mutationen und dem Krankheitsverlauf besteht. Hierfür soll die DNA von 96 Leberzirrhosepatienten unterschiedlicher Ätiologie und 48 gesunden Probanden auf Nukleotidvarianten im *TCAB1*-Gen untersucht werden und die Allelfrequenz möglicher Genvarianten verglichen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Hypothese zu belegen, dass eine Mutation von *TCAB1* mit einem schnelleren Verlauf der Leberzirrhose assoziiert ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### *2.1.1 Reagenzien*

<i>Reagenzien</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose	Sigma-Aldrich Corp
Borsäure 99.8% p.a	Karl Roth GmbH + Co. KG
Colorless GoTaq® Flexi Buffer (5x)	Promega GmbH
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs Mix 10mM)	Promega GmbH
Ethylen-diamin Tetraessigsäure (EDTA) 99.9% p.a.	Karl Roth GmbH + Co. KG
Ethidiumbromid	Karl Roth GmbH + Co. KG
GoTag DNA Polymerase	Promega GmbH
Nuclease-freies Wasser	Ambion®
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Primer	Sigma-Aldrich Corp.
Tris-Base 121.14 g/mol	Sigma-Aldrich Corp.

#### *Trisborat-EDTA Puffer (25x TBE)*

302.75g Trisbase, 137.57g Borsäure sowie 0.3g EDTA wurden mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
8er Kette opt. klar fl. Deckel	Sarstedt AG&Co
96 well Multiply PCR Platte	Sarstedt AG&Co
Combitips 0,1 ml	Eppendorf AG
DNA Ladder	Invirtogen AG
Multiply- $\mu$ Strip Pro 8er Kette	Sarstedt AG&Co
Parafilm	Bemis Company Inc.
Pipette tips (10, 20, 100, 1000 $\mu$ l)	StarLab International GmbH
RNAse Away	Sigma-Aldrich Corp.
Tubes 2.0 ml	Eppendorf AG
Wägebapier	Macherey-Nagel GmbH &CoKG

### 2.1.3 Laborausstattung

<u>Laborausstattung</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose-Gelelektrophorese-Apparat	Biometra GmbH
Elektrophorese Power Supply	GIBCO®
Illuminator	VWR® International
Kolben	Simax®
PCR Cycler	Eppendorf AG
Pipetten (1, 10, 20, 100, 1000 $\mu$ l)	Eppendorf AG
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH
Mini Mikrozentrifuge	Corning Inc.
Multipette	Eppendorf AG
Vortex Mixer	Corning Inc.
Waage	Kern & Sohn GmbH
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG

---

## 2.2 Methoden

### *2.2.1 Probenauswahl*

Im Rahmen der Mutationsanalyse wurden insgesamt 144 verschiedene DNA-Proben verwendet, welche sich wie folgt zusammensetzten: 48 Proben stammten von Patienten, welche aufgrund eines chronischen Alkoholabusus eine Leberzirrhose entwickelten. Die zur Verfügung gestellten Daten umfassten neben Geburtsdatum, Geschlecht und Herkunft der Patienten, den Child-Pugh-Score, das Vorhandensein einer Enzephalopathie oder Aszites, aufgetretene Komplikationen, wie Leberversagen oder Tod, sowie den Krankheitsverlauf und Laborparameter.

48 weitere DNA-Proben stammten von Leberzirrhotikern mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion. Die bekannten klinischen Daten umfassten neben Geburtsdatum, Geschlecht und Herkunft der Patienten, Angaben zu Datum der Infektion, Übertragungsweg, Dauer der Infektion, Genotyp, Viruslast, Daten zu durchgeführten Leberbiopsien sowie weitere Laborparameter (Aspartat-Aminotransferase, AST; Alanin-Aminotransferase, ALT).

Die Kontrollkohorte umfasste 48 DNA-Proben gesunder Patienten, welche nach Geschlechts- und Altersverteilung der Studiengruppe ausgesucht wurde.

Die Proben wurden freundlicherweise von den nachfolgenden Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt: (i) Hôpital Jean Verdier in Bondy Cedex, Frankreich, (ii) Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Deutschland, (iii) Henriettenstiftung Hannover, Deutschland, (iv) Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Universität von Ulm.

### *2.2.2 PCR*

Zur Vervielfältigung der zehn im *TCAB1* Gen bekannten Exons wurden Polymerasekettenreaktionen (Polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt. Pro Patient wurden dreizehn Primerpaare verwendet. Pro Patientenprobe wurden 26 Sequenzen, also pro Primerpaar jeweils eine Vorwärts- und eine Rückwärts-Sequenz, untersucht.



Für jede PCR wurden 10 µl 5x Colorless GoTaq Flexi Buffer, 2µl MgCl<sub>2</sub> Solution (25 mM), 1µl dNTPs (10 mM), 1µl forward primer, (10 µM, ges. 0,2 µM), 1µl reverse primer (10 µM, ges. 0,2 µM), 0,25 µl GoTaq DNA Polymerase, 34,25 µl nukleasefreies Wasser und 0,5 µl DNA verwendet (Quelle PCR Protokoll: Zhong et al. [55])

Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95° C für zehn Minuten (ein Zyklus). Die Denaturierung lief bei 95° C für dreißig Sekunden ab (achtunddreißig Zyklen). Das Annealing wurde für 45 Sekunden 38 Zyklen lang bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt; siehe hierzu Tabelle 4. Die Verlängerung erfolgte bei 72° C (45 Sekunden, 38 Zyklen), gefolgt von der endgültigen Verlängerung (72°C, zehn Minuten, ein Zyklus). Anschließend erfolgte die Kühlung bei 4°C.

**Tabelle 2:** Darstellung der zur PCR verwendeten Primer. In der Tabelle sind die Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen sowie deren Annealingtemperatur in °C dargestellt.

<b>Exon</b>	<b>Primer (vorwärts)</b>	<b>Primer (rückwärts)</b>	<b>T<sub>Annealing</sub> [c°]</b>
1a	GGGAACGGGAAACCTTCTAA	GACAGCAGTCCGGAGCTAAC	63
1b	CTAATCTCCGCTGTGCTTCC	TCTTCTGCAGGAAGGCTTGT	59,4
1c	GGGACCCAGTTTCTCTCTCC	CTGGAGAAGTGGGTCTCAGG	63
2	GTGGAGTCTGGGGAGATGAA	GGGCATCCCTCTCCTAGAAA	63
3	CAGCCCTAGCCCTACACTTG	TGCTGCCACAAGAAATTCAC	63
4	TCTGAGCTCACCCCTTGAACA	CTGACCAGCCCCTCTGATAA	63
5	ACACCCAGCCTCATTTTTGT	GGAAGGAAAGGGCTGAAAAC	59,4
6	TCATATCTGGGACGCATTCA	GTACAGAGGACGGCGTGAAC	63
7a	GCTTGTGACAGACAGCATGG	TCTCAGGGTGTGACCCCTAC	59,4
7b	TCTGTATGCCTGGGATGATG	ATTGGTGGTCACCTCTCGAC	63
8	CTGAAGGAGTGCCTGGAGAC	ACCCTACAGCTGGGCTCTG	63
9	CCTCTGCCAGCAAATCTCTC	TCTCTGTGGGCTCAGGAAAC	59,4
10	AGAGGGAGCAAGTGTCTCA	GCCTGGTTTCAGGACCAATA	59,4

### 2.2.3 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese eines 2%-igen Agarosegels in 1x TBE-Puffer, der durch Verdünnung von 25x TBE-Puffer hergestellt wurde, wurde überprüft, ob die PCR erfolgreich abgelaufen war. Zur Herstellung des Gels wurde 4g Agarose mit 200ml 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, anschließend wurden 10µl Ethidiumbromid zugefügt. Die Elektrophorese wurde mit 1xTBE als Laufpuffer und

20µl Reaktionsprodukt bei 120 Volt für zwanzig Minuten durchgeführt. Die Banden wurden im Illuminator unter ultraviolettem Licht visualisiert und fotografiert.

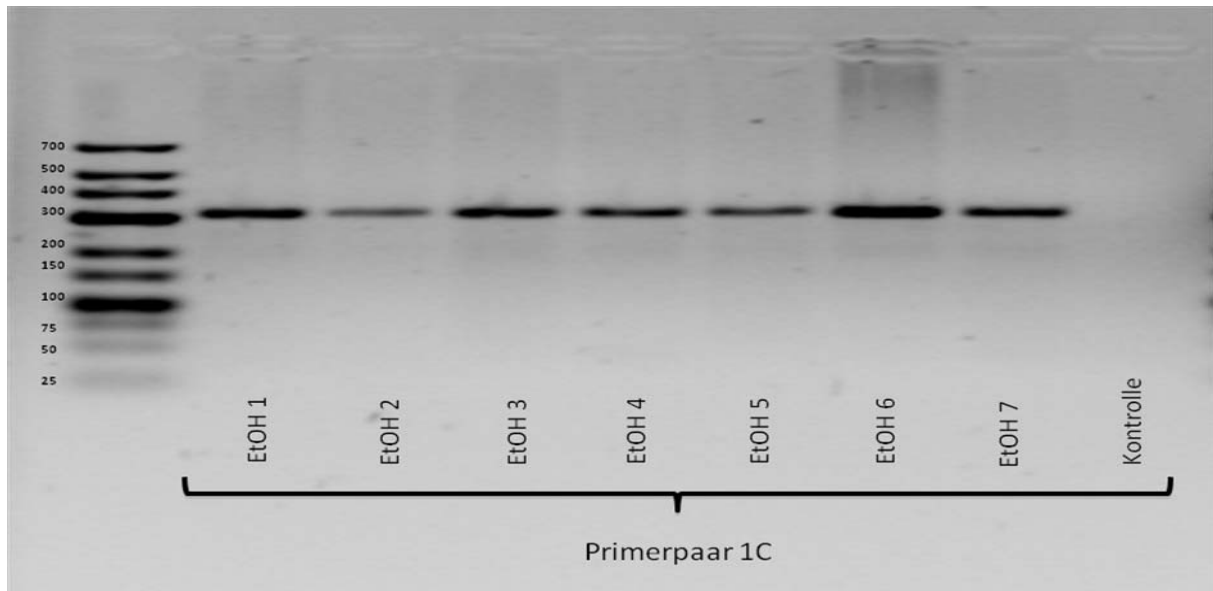


Abbildung 7: Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel; „EtOH 1-7“: DNA der Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose; die Kontrolle erfolgte mit nukleasefreiem Wasser.

#### 2.2.4 Sequenzierung

Nach erfolgreich abgelaufener PCR wurden die Proben in 96-Well-Plates aliquotiert und zur Sequenzierung an die Abteilung für Genomanalyse des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung nach Braunschweig geschickt.

#### 2.2.5 Sequenzanalyse

Um eventuelle Mutationen zu identifizieren, wurden mit dem Programm FinchTV 1.4.0 die Chromatogramme der DNA-Sequenzierung betrachtet und mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurden Patienten- und Wildtyp-Sequenzen miteinander verglichen.

---

```

1      gtcccggctc  cgcgggttcc  gtgggtcgcc  cgcgaaatct  gatccgggat  gcggcggccc
61     aatcggaagg  tggaccgaaa  tcccgcgaca  gcaagaggcc  cgtagcgacc  cgcggtgcta
121    aggaacacag  tgctttcaaa  agaattggcg  tccgctgttc  gcctctcctc  cggggagtct
181    tctgcctact  cccagaagag  gaggggaagca  cagggtgggtt  tcttttagctc  tgcgtcggat
241    ccctgagaac  ttcgaagcca  tcctggctga  ggctaatactc  cgctgtgctt  cctctgcagt
301    atgaagactt  tgggagactca  accgttagct  cgggactgct  gtccttcaga  ccaggacca
361    gctccagccc  atccttctcc  ccacgcttcc  ccgatgaata  aaaatgcgga  ctctgaactg
421    atgccaccgc  ctcccgaaag  gggggatccg  ccccggttgt  ccccgatcc  tgtggctggc
481    tcagctgtgt  cccaggagct  acgggagggg  gaccagttt  ctctctccac  tcccctggaa
541    acagagtttg  gttcccctag  tgagttgagt  cctcgaatcg  aggagcaaga  actttctgaa
601    aatacaagcc  ttcctgcaga  agaagcaaac  gggagccttt  ctgaagaaga  agcgaacggg
661    ccagagttgg  ggtctggaaa  agccatggaa  gatacctctg  gggaaaccgc  tgcagaggac
721    gagggagaca  ccgcttggaa  ctacagcttc  tcccagctgc  ctcgatttct  cagtggttcc
781    tggtcagagt  tcagcaccca  acctgagaac  ttcttgaaag  gctgtaagtg  ggctcctgac
841    ggttcctgca  tcttgaccaa  tagtgctgat  aacatcttgc  gaatttataa  cctgccccca
901    gagctgtacc  atgaggggga  gcaggtggaa  tatgcagaaa  tggtcctctg  ccttcgaatg
961    gtggaagggtg  ataccatcta  tgattactgc  tggatttctc  tgatgtcctc  agccagcca
1021   gacacctcct  acgtggccag  cagcagccgg  gagaaccgca  ttcatatctg  ggacgcattc
1081   actggagagc  tccgggcttc  ctttcgcgcc  tacaaccacc  tggatgagct  gacggcagcc
1141   cattcgctct  gcttctcccc  ggatggctcc  cagctcttct  gtggcttcaa  cgggactgtg
1201   cgtgtttttt  ccacggcccg  gcctggccga  gactgcgagg  tccgagccac  atttgcaaaa
1261   aagcagggcc  agagcggcat  catctcctgc  atagccttca  gcccagccca  gcccctctat
1321   gcctgtggct  cctacggccg  ctccctgggt  ctgtatgcct  gggatgatgg  ctccccctc
1381   gccttgctgg  gagggcacca  agggggcacc  acccaccctc  gctttcatcc  cgatggcaac
1441   cgcttcttct  caggagcccg  caaggatgct  gagctcctgt  gctgggatct  ccggcagtct
1501   ggttaccac  tgtggtcctt  gggtcgagag  gtgaccacca  atcagcgcct  ctacttcgat
1561   ctggaccgca  ccgggcagtt  cctagtgagt  ggcagcacga  gcggggctgt  ctctgtgtgg
1621   gacacggacg  ggcttgcaa  tgatgggaag  ccggagcccg  tgttgagttt  tctgccccag
1681   aaggactgca  ccaatggcgt  gagcctgcac  cctagcctgc  ctctcctggc  cactgcctcc
1741   ggtcagcgtg  tgtttctga  gccacagag  agtggggacg  aaggagagga  gctgggcctt
1801   cccttgctct  ccacgcgcca  cgtccacctt  gaatgtcggc  ttcagctctg  gtgggtgtggg
1861   ggggcgccag  actccagcat  ccctgatgat  caccagggcg  agaaagggca  gggaggaacg
1921   gagggaggtg  tgggtgagct  gatataaaaa  ggtttttatg  ataaaaaaaa  aaaaaaaaaa
1981   aa

```

**Abbildung 8:** Nucleotidsequenz der mRNA, TCAB1 Homo sapiens, Exon 1-10; Reference Sequence: NM\_018081.2; nach der Datenbank des NCBI.

### 2.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde unter Zuhilfenahme der Programme Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 5 durchgeführt. Die statistischen Signifikanzen wurden unter Zuhilfenahme des exakten Fisher-Tests oder Chi-Square Tests berechnet. P-Werte kleiner 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Demographische Verteilung der Studiengruppen

Für diese Studie wurden insgesamt drei Patientengruppen (à 48 Patienten) zusammengestellt: Eine Studiengruppe bestehend aus Patienten mit Alkoholbedingter Leberzirrhose (Gruppe EtOH), eine Gruppe von Patienten mit HCV-induzierter Leberzirrhose (Gruppe HCV) und eine Kontrollkohorte. Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Verteilung von Geschlecht (Tabelle 5), Alter (Tabelle 6) und Ethnizität (Tabelle 7) der Patienten mit Alkoholbedingter Leberzirrhose (Gruppe EtOH), HCV-induzierter Leberzirrhose (Gruppe HCV) und der Kontrollkohorte.

Die Gruppe der ethyltoxisch-bedingten Leberzirrhosen bestand aus 35 männlichen Patienten (72,9%) und 13 weiblichen Patientinnen (27,1%). Die Geschlechterverteilung in der Gruppe der HCV-induzierten Leberzirrhosen lag bei 28 männlichen Patienten (58,3%) und 20 weiblichen Patientinnen (27,1 %). Die Anzahl der männlichen Patienten in der Kontrollgruppe betrug 35 männliche Patienten (72,9%) und 13 weibliche Patientinnen (27,1%). Eine Übersicht hierzu zeigt die nachfolgende Tabelle 5.

Tabelle 3: Geschlechterverteilung innerhalb der Patientengruppen

<b>Geschlecht</b>	<b>Anzahl EtOH (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl HCV (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl Kontrollgruppe (Verteilung in %)</b>
<b>männlich</b>	35 (72,9)	28 (58,3)	35 (72,9)
<b>weiblich</b>	13 (27,1)	20 (41,7)	13 (27,1)

Tabelle 6 gibt die Altersverteilung und das durchschnittliche Alter der unterschiedlichen Patientengruppen an. Drei Patienten (6,3%) aus der Gruppe der ethyltoxisch-bedingten Leberzirrhosen waren vierzig Jahre und jünger, sieben Patienten (14,6%) zwischen 41 und fünfzig Jahren alt, 21 Patienten (43,8%)

zwischen 51 und 60 Jahren alt, 13 Patienten (27.1 %) von ihnen zwischen 61 und siebzig Jahren und vier Patienten (8.3%) waren siebzig Jahre oder älter. Das Durchschnittsalter der Patienten dieser Gruppe betrug 58 Jahre.

Die Altersverteilung der Gruppe HCV-infizierter Patienten gestaltete sich wie folgt: 9 Patienten (18.8%) waren vierzig Jahre alt oder jünger, 18 Patienten (37.5%) waren zwischen 41 und fünfzig Jahre alt, zwölf Patienten (25.0%) zwischen 51 und sechzig, neun Patienten (18.8%) zwischen 61 und siebzig. Keiner der Patienten war älter als siebzig Jahre. Der Altersdurchschnitt lag bei 48 Jahren.

Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe betrug 57,4 Jahre. Vier Patienten (8.3%) waren vierzig Jahre oder jünger, zwei Patienten (4.2%) zwischen einundvierzig und fünfzig. Zwischen 51 und sechzig Jahren waren 24 Patienten (50%), zwischen 61 und siebzig Jahren alt waren fünfzehn Patienten (31.3%). Über siebzig waren drei (6.3%) Patienten.

Tabelle 4: Altersverteilung und Durchschnittsalter der Patientengruppen.

<b>Alter in Jahren</b>	<b>Anzahl EtOH (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl HCV (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl Kontrollgruppe (Verteilung in %)</b>
<b>≤40</b>	3 (6,3)	9 (18,8)	4 (8,3)
<b>41-50</b>	7 (14,6)	18 (37,5)	2 (4,2)
<b>51-60</b>	21 (43,8)	12 (25,0)	24 (50,0)
<b>61-70</b>	13 (27,1)	9 (18,8)	15 (31,3)
<b>&gt;70</b>	4 (8,3)	0	3 (6,3)
<b>Durchschnittsalter</b>	58	48	57,4

Einen Überblick über die ethnische Herkunft der eingeschlossenen Patienten liefert Tabelle 7. 44 Patienten (91,7%) der Gruppe der Alkohol-bedingten Leberzirrhosen waren kaukasischer Abstammung und vier (8,3%) afrikanischen Ursprungs. 46

Patienten (95,8%) der HCV-bedingten Leberzirrhotiker waren kaukasischer Abstammung und zwei Patienten (4,2%) waren asiatischen Ursprungs. Zu der Kontrollgruppe zählten 44 Kaukasier (91,7%) und vier Afrikaner (8,3%).

Tabelle 5: Ethnische Herkunft innerhalb der Patientengruppen.

<b>Ethnizität</b>	<b>Anzahl EtOH (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl HCV (Verteilung in %)</b>	<b>Anzahl Kontrollgruppe (Verteilung in %)</b>
<b>Kaukasisch</b>	44 (91,7)	46 (95,8)	44 (91,7)
<b>Afrikanisch</b>	4 (8,3)	0	4 (8,3)
<b>Asiatisch</b>	0	2 (4,2)	0

### 3.2 Auswertung der Mutationsanalyse

#### *3.2.1 Studiengruppe Alkohol-induzierte Leberzirrhose*

Es wurden bei den 48 Patientenproben mit Alkohol-induzierter Leberzirrhose die Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzierungen der 13 Exons im TCAB1-Gen untersucht. Dabei wurden sieben verschiedene von der TCAB1-Wildtypsequenz abweichende Veränderungen ermittelt. Tabelle 8 gibt einen Überblick über diese nachgewiesenen Polymorphismen sowie deren Häufigkeit. Insgesamt wurden in der aus insgesamt 48 Patienten bestehenden Studiengruppe 38 Nukleotidvarianten gefunden, die sich folgendermaßen verteilten: 2x r.56G>C, 11x c.202C>G, 6x c.450C>T, 1x c.936C>T, 1x c.1308T>C, 16x c.1565C>G, 1x c.1566G>A.

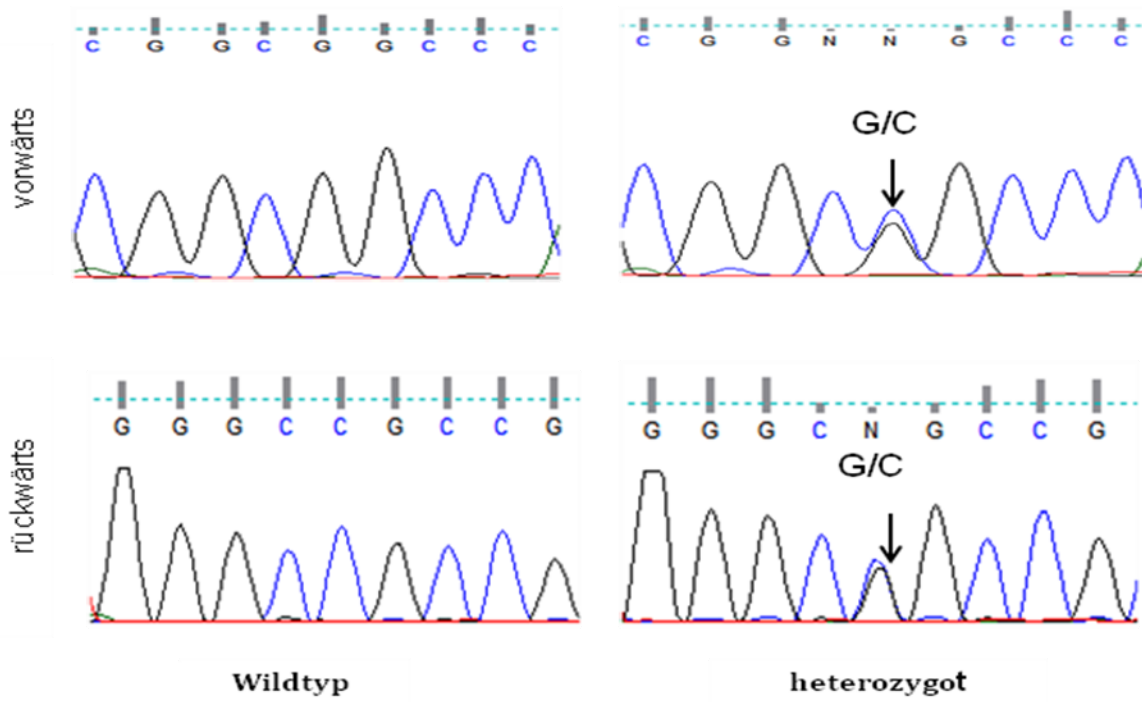


**Tabelle 6:** Auflistung der identifizierten TCAB1-Genvarianten (Exons 1-10 und 3'UTR) in der Studiengruppe der ethyltoxisch-bedingten Leberzirrhosen. Die Tabelle zeigt die Nukleotidvariante sowie die Aminosäurevariante (dargestellt im Einbuchstabencode), die Anzahl der Homozygoten und der Heterozygoten sowie der Allelfrequenz. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Nukleotidvarianten führen zu keinem Austausch in der Aminosäuresequenz. Des Weiteren zeigt die Tabelle die Referenz bereits beschriebener Polymorphismen (SNP Database des National Center for Biotechnology Information [NCBI]).

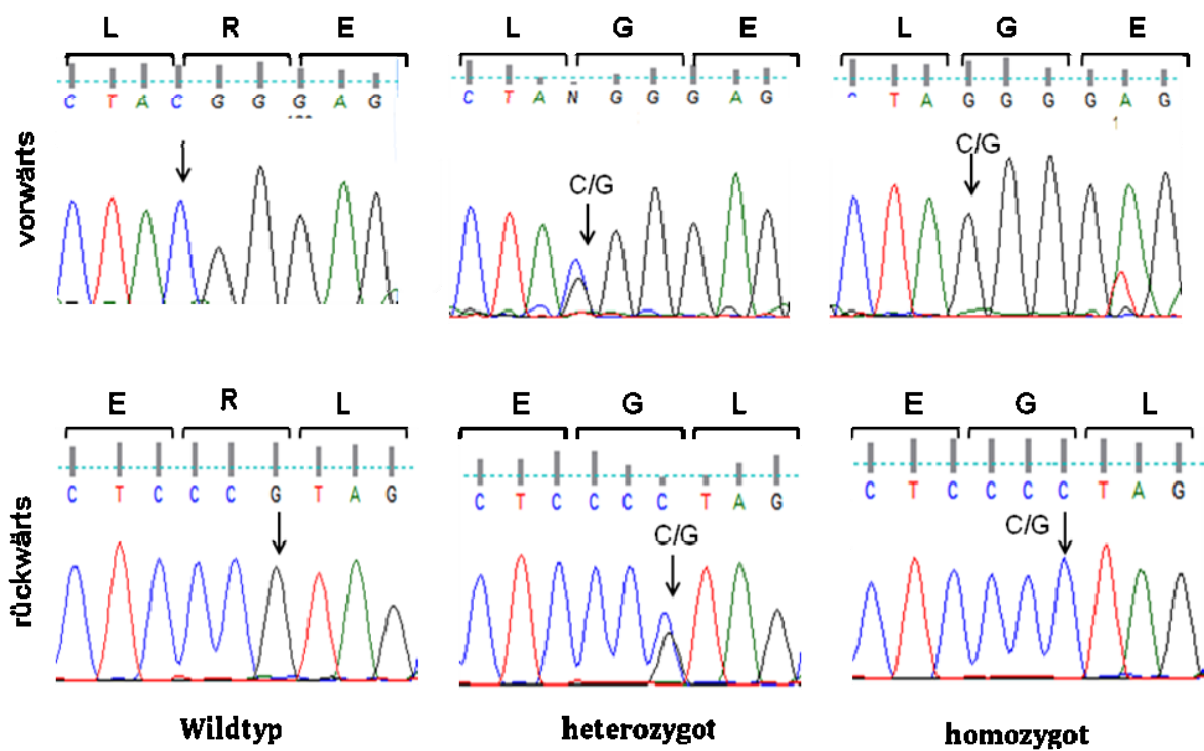
<b>Gen- abschnitt</b>	<b>Nukleotid- variante</b>	<b>Aminosäure- variante</b>	<b>Studiengruppe EtOH (n=48) Anzahl heterozygote; Anzahl homozygote (Allelfrequenz)</b>	<b>Referenz Polymorphismus</b>
<b>3'UTR</b>	<b>r.56G&gt;C</b>	<b>---</b>	<b>2;0 (0,021)</b>	
<b>TCAB1</b>	<b>c.202C&gt;G</b>	<b>p.R68G</b>	<b>10;1 (0,125)</b>	<b>rs2287499</b>
	<b>c.450C&gt;T*</b>	<b>p.F150F</b>	<b>6;0 (0,063)</b>	<b>rs2287498</b>
	<b>c.936C&gt;T*</b>	<b>p.C312C</b>	<b>1;0 (0,010)</b>	<b>rs73248508</b>
	<b>c.1308T&gt;C*</b>	<b>p.A436A</b>	<b>1;0 (0,010)</b>	<b>rs34016213</b>
	<b>c.1565C&gt;G</b>	<b>p.A522G</b>	<b>12;4(0,208)</b>	<b>rs7640</b>
	<b>c.1566G&gt;A*</b>	<b>p.A522A</b>	<b>1;0 (0,010)</b>	<b>rs148329158</b>
<b>Gesamt</b>			<b>33;5 (0,034)</b>	

Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt verschiedene Chromatogramme der identifizierten Nukleotidvarianten in der Studiengruppe. Diese Sequenz wird der Wildtyp-Sequenz gegenübergestellt. Abgebildet ist jeweils die Vorwärts- sowie Rückwärts-Sequenz.

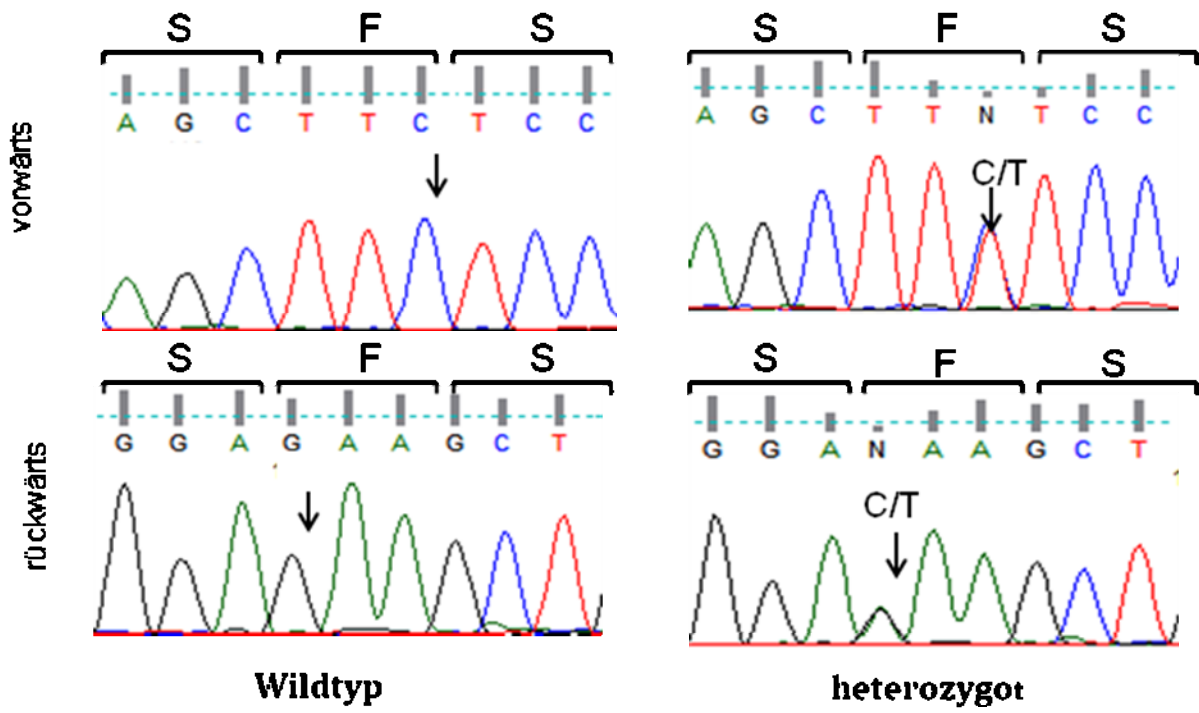
**A**



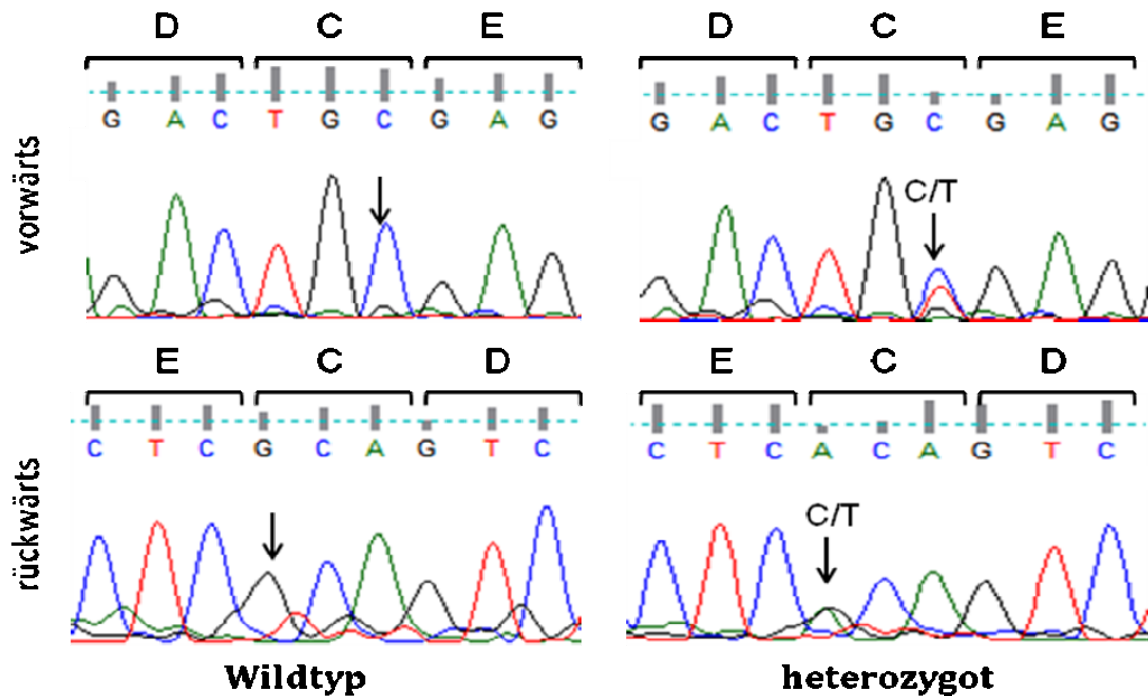
**B**



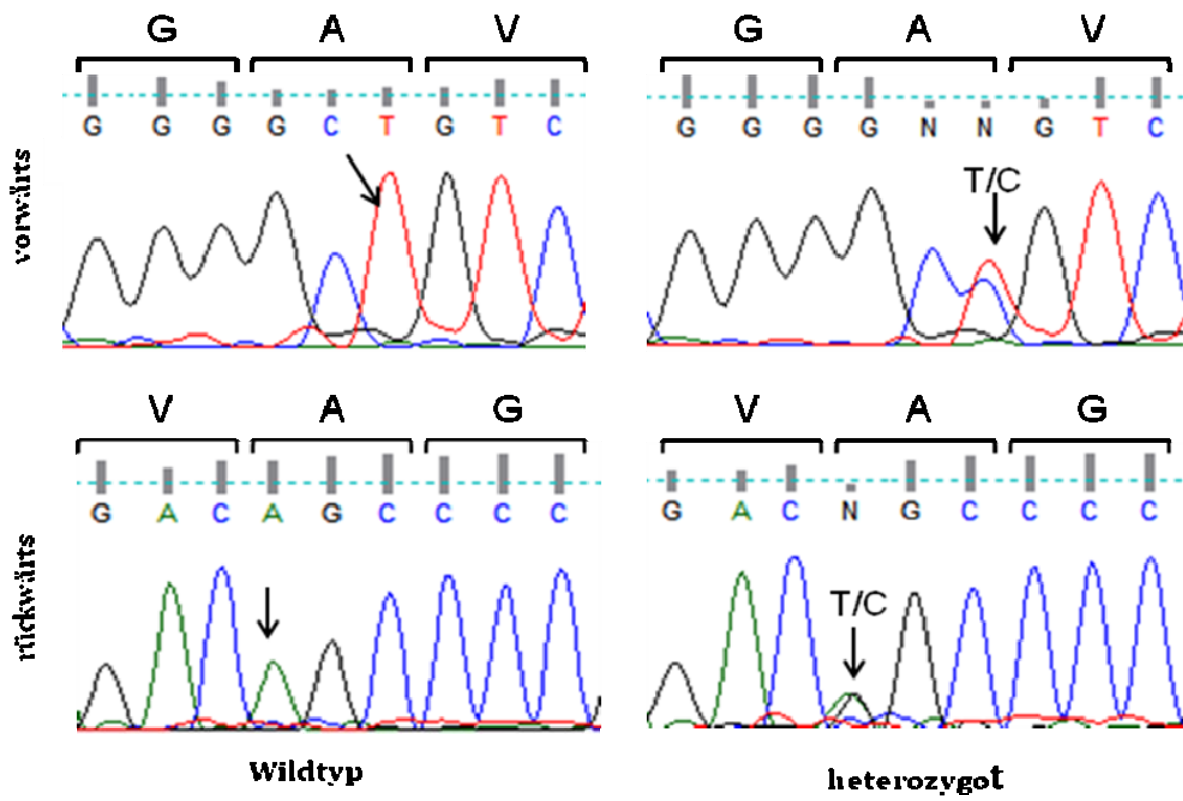
C



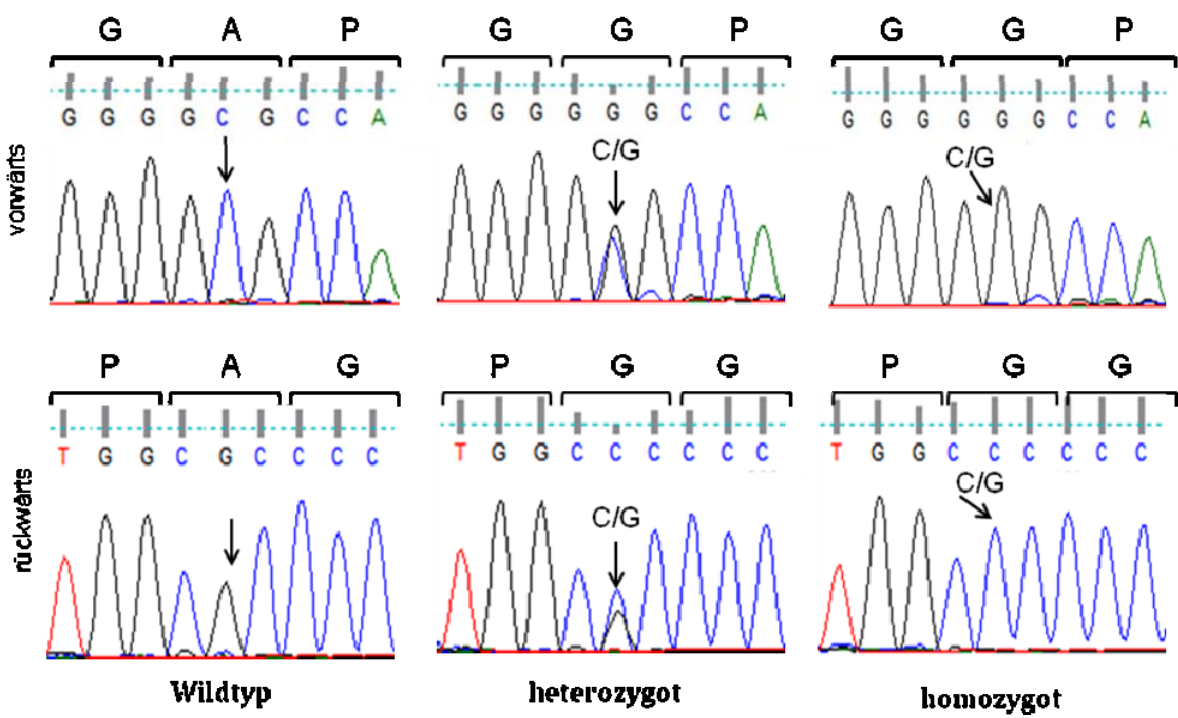
D



F



F



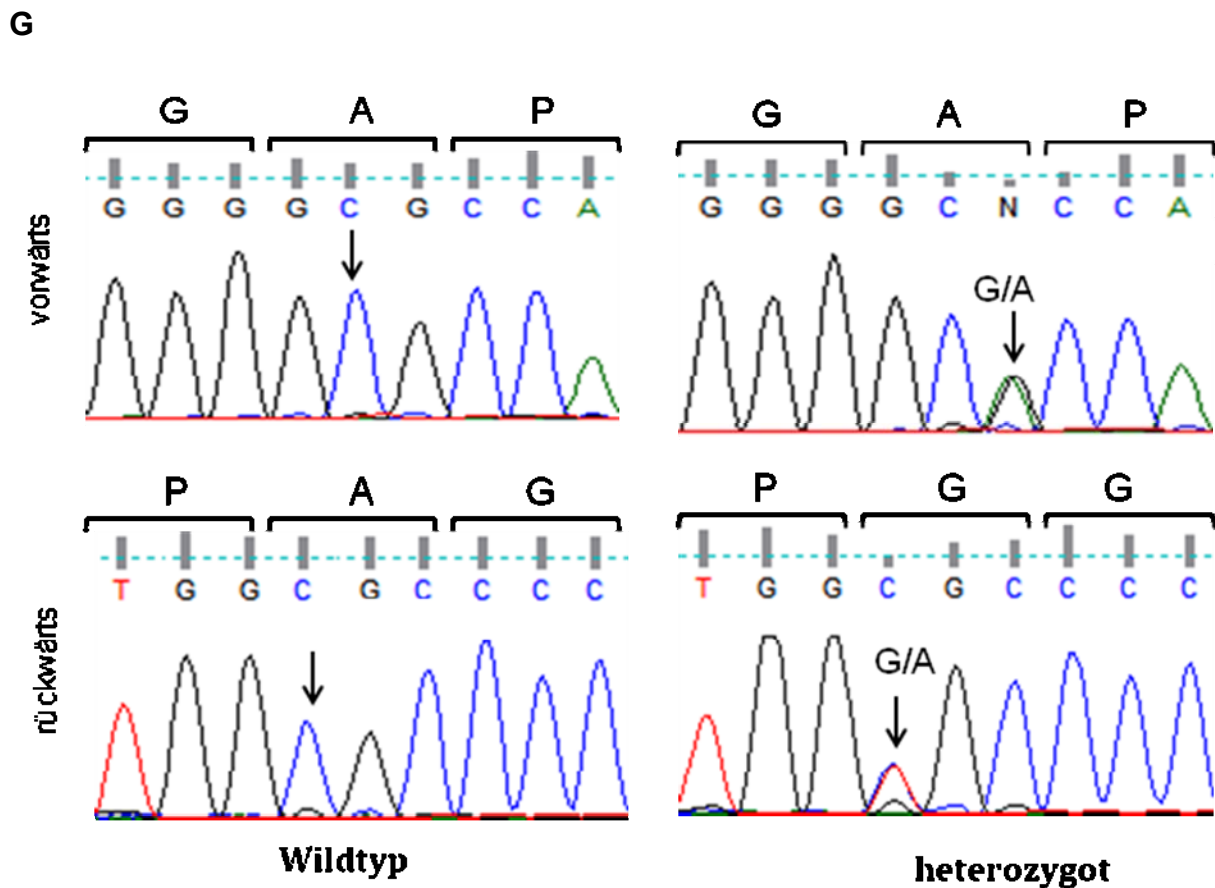


Abbildung 9: Die Abbildungen zeigen die Chromatogramme der identifizierten Nukleotidsequenzvarianten in der Gruppe der ethyltoxisch bedingten Leberzirrhosen. Dargestellt ist die heterozygote und gegebenenfalls homozygote Variante in je Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz. Ebenfalls abgebildet ist die zugehörige Wildtyp-Sequenz. Über den eckigen Klammern steht die zum Basentriplet gehörige Aminosäure im Einbuchstabencode.

**(A)** Chromatogramme der Variante r.56G>C (3'UTR), **(B)** Chromatogramme der Variante c.202C>G p.R68G (Exon 1B), **(C)** Chromatogramme der Variante c.450C>T p.F150F (Exon2), **(D)** Chromatogramme der Variante c.936C>T p.C312C (Exon 6), **(E)** Chromatogramme der Variante c.1308T>C p.A436A (Exon 9), **(F)** Chromatogramme der Variante c.1565C>G p.A522G (Exon 10), **(G)** Chromatogramme der Variante c.1566G>A p.A522A (Exon10).

### 3.2.2 Studiengruppe Hepatitis-C-Virus-induzierte Leberzirrhose

Die dreizehn Exons in TCAB1 inklusive 3'UTR (Untranslated Region; untranslatierter Bereich) der 48 Patienten mit HCV-induzierter Leberzirrhose wurden ebenfalls analysiert. In dieser Studiengruppe wurden sechs von der Wildsequenz abweichende Sequenzen gefunden. Tabelle 9 zeigt diese identifizierten Sequenzabweichungen. Bei den 48 Proben dieser Kohorte wurden insgesamt fünfzig Nukleotidvarianten aufgefunden: 4x r. 56G>C, 10x c.202C>G, 7x c.450C>T, 1x c.663G>A, 1x c.1308T>C, 27x c.1565C>G.

**Tabelle 7:** Auflistung der identifizierten TCAB1-Genvarianten (Exons 1-10 mit 3'UTR) und ihrer Häufigkeiten in der Studiengruppe der HCV-infizierten Patienten. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Nukleotidvarianten führen zu keinem Austausch in der Aminosäuresequenz.

Gen- abschnitt	Nukleotid- variante	Aminosäure- variante	Studiengruppe HCV (n=48) Anzahl heterozygote; Anzahl homozygote (Allelfrequenz)	Referenz Polymorphismus
3'UTR	r. 56G>C	---	3;1 (0,052)	
TCAB1	c.202C>G	p.R68G	10;0 (0,104)	rs2287499
	c.450C>T*	p.F150F	7;0 (0,073)	rs2287498
	c.663G>A*	p.V221V	1;0 (0,010)	---
	c.1308T>C*	p.A436A	1;0 (0,010)	rs34016213
	c.1565C>G	p.A522G	23;4 (0,323)	rs7640
<b>Gesamt</b>			<b>45;5 (0,044)</b>	

### 3.2.3 Kontrollgruppe

Tabelle 10 zeigt die identifizierten Sequenzvarianten der 48 Patienten der Kontrollgruppe. Analysiert wurde jeweils die Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz der zehn Exons (mit 3'UTR) in TCAB1. Dabei wurden in dieser Kohorte sieben verschiedene Wildtypsequenzabweichungen identifiziert. Insgesamt wurden 41 Abweichungen bei der Sequenzanalyse ermittelt: 2x r. 56G>C, 12x c.202C>G, 6x c.450C>T, 1x c.919C>T, 1x c.1308T>C, 18x c.1565C>G, 1x c.1566G>A.

Tabelle 8: Darstellung der TCAB1-Sequenzvarianten (Exon 1-10 und 3'UTR) der Kontrollgruppe und ihrer Häufigkeiten. Die Nukleotidvarianten, die mit einem Stern (\*) gekennzeichnet sind, führen zu keinem Austausch in der Aminosäuresequenz.

Gen- abschnitt	Nukleotid- variante	Aminosäure- variante	Kontrollgruppe (n=48) Anzahl heterozygote; Anzahl homozygote (Allelfrequenz)	Referenz Polymorphismus
3'UTR	r. 56G>C	---	1;1 (0,031)	---
TCAB1	c.202C>G	p.R68G	8;4 (0,167)	rs2287499
	c.450C>T*	p.F150F	5;1 (0,073)	rs2287498
	c.919C>T	p.R307W	1;0 (0,010)	rs149828392
	c.1308T>C*	p.A436A	1;0 (0,010)	rs34016213
	c.1565C>G	p.A522G	13;5 (0,24)	rs7640
	c.1566G>A*	p.A522A	1;0 (0,010)	rs148329158
<b>Gesamt</b>			<b>30;11(0,042)</b>	

---

### 3.3 Kein signifikant erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Mutationen in den Studiengruppen

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 3.744 DNA-Sequenzen ausgewertet und auf Nukleotidvarianten untersucht, um die Allelfrequenz möglicher Genvarianten bei 96 Patienten mit Leberzirrhose zweier unterschiedlicher Ätiologien und 48 gesunden Patienten zu ermitteln. Zur Bestimmung der Signifikanzwerte wurden der exakte Fischer-Test oder Chi-Square-Test verwendet. Die aus den Allelfrequenzen der identifizierten Sequenzvarianten ermittelten p-Werte wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Es liegt daher kein signifikant erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Polymorphismen in einer der Patientengruppen vor. Dies gilt für den Vergleich der Werte der beiden Studiengruppen (Gruppe EtOH und HCV), der Gruppe EtOH mit der Kontrollgruppe als auch der Gruppe HCV mit der Kontrollgruppe.

Tabelle 11 gibt einen Gesamtüberblick über die ermittelten Nukleotid- und Aminosäurevarianten in den verschiedenen Patientengruppen, ihre Häufigkeit sowie die Referenznummer eventuell vorbeschriebener SNPs (single nucleotide polymorphisms; Einzelnukleotidpolymorphismen) laut SNP Database des National Center for Biotechnology Information (NCBI).



**Tabelle 9:** Gegenüberstellung der ermittelten TCAB1-Genvarianten (Exon 1-10 mit 3' UTR) und ihrer Häufigkeiten in den Studiengruppen und der Kontrollgruppe. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Nukleotidvarianten führen zu keinem Austausch in der Aminosäuresequenz.

Genabschnitt	Nukleotidvariante	Aminosäurevariante	Studien- gruppe EtOH (n=48)	Studien- gruppe HCV (n=48)	Kontroll- gruppe (n=48)	Referenz Polymor- phismus
			Anzahl homozygote; Anzahl heterozygote (Allelfrequenz)			
3'UTR	r. 56G>C	---	2;0 (0,021)	3;1 (0,052)	1;1 (0,031)	
TCAB1	c.202C>G	p.R68G	10;1 (0,125)	10;0 (0,104)	8;4 (0,167)	rs2287499
	c.450C>T*	p.F150F	6;0 (0,063)	7;0 (0,073)	5;1 (0,073)	rs2287498
	c.663G>A*	p.V221V	0	1;0 (0,010)	0	---
	c.919C>T	p.R307 W	0	0	1;0 (0,010)	rs149828392
	c.936C>T*	p.C312C	1;0 (0,010)	0	0	rs73248508
	c.1308T>C*	p.A436A	1;0 (0,010)	1;0 (0,010)	1;0 (0,010)	rs34016213
	c.1565C>G	p.A522G	12;4 (0,208)	23;4 (0,323)	13;5 (0,24)	rs7640
	c.1566G>A*	p.A522A	1;0 (0,010)	0	1;0 (0,010)	rs148329158
<b>Gesamt</b>			<b>33;5(0,034)</b>	<b>45;5 (0,044)</b>	<b>30;11 (0,042)</b>	

### 3.4 Korrelation klinischer Daten mit dem Auftreten von homozygoten TCAB1-Einzelnukleotidpolymorphismen der EtOH-Gruppe

Nach Auswertung der DNA-Sequenzen der 48 Patienten der Gruppe ethyltoxisch bedingter Leberzirrhosen wurden die Ergebnisse mit den klinischen Patientendaten, insbesondere dem Erkrankungsverlauf, verglichen. Abbildung 10 gibt einen Überblick

über den Krankheitsverlauf der Patienten. Bei 61% der Patienten wurde ein stabiler Krankheitsverlauf beschrieben, bei 29% der Patienten kam es im Verlauf zu einer Verschlechterung des Zustandes bzw. zu einem Leberversagen. Bei 4% der Patienten wurden andere Komplikationen beobachtet, z.B. die Entstehung eines Hepatozellulären oder Cholangiozellulären Karzinoms.

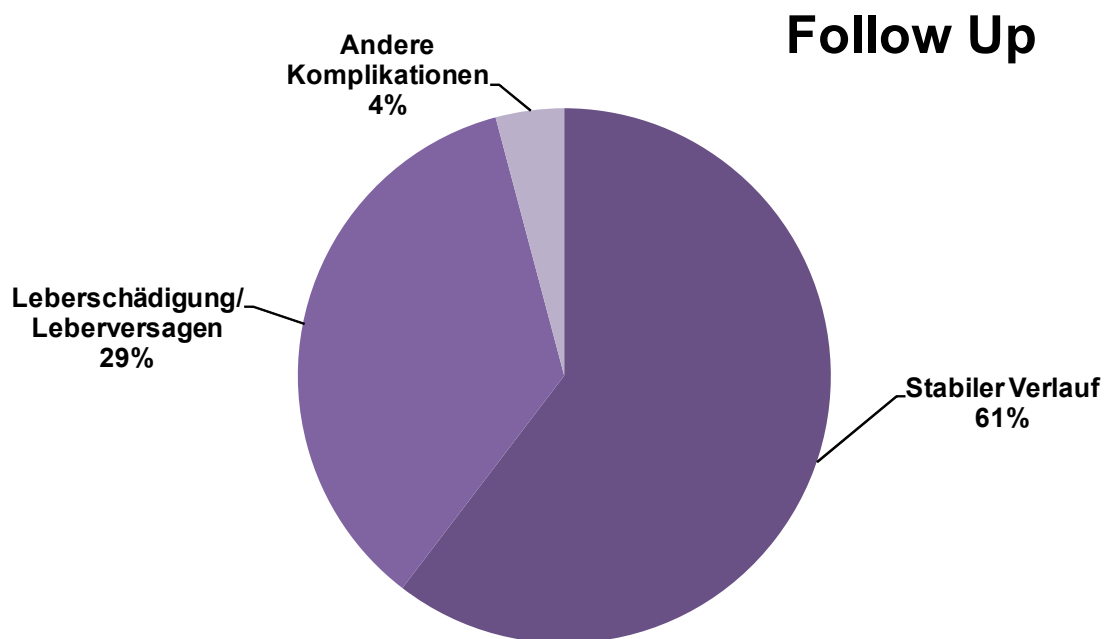
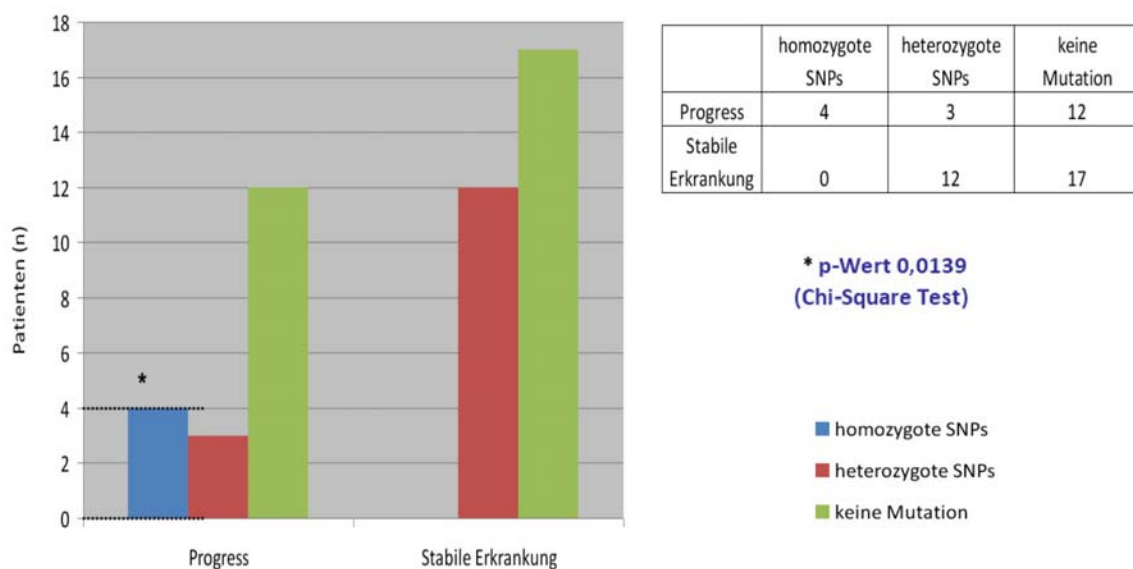


Abbildung 10: Überblick über den Krankheitsverlauf der Gruppe alkoholbedingter Leberzirrhosen.

Unter Berücksichtigung dieser Daten wurden die Krankheitsverläufe der Mutationsträger mit Patienten verglichen, die keine Auffälligkeiten bei der Sequenzanalyse zeigten. Hierbei wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von TCAB1-Einzelnukleotidpolymorphismen und einem Progress des Krankheitsverlaufes (z.B. Leberversagen, Auftreten eines hepatozellulären oder cholangiozellulären Karzinoms oder Tod des Patienten) festgestellt (siehe hierzu Abbildung 11). Die homozygoten Allelvarianten, die bei den Patienten mit Alkoholbedingter Leberzirrhose identifiziert wurden, waren: c.202C>G p.R68G, c.1565C>G p.A522G. In beiden Fällen kommt es zu einem Austausch der Aminosäuren.

Vier Patienten, die Träger eines homozygoten Einzelnukleotidpolymorphismus waren, zeigten einen raschen Progress der Leberzirrhose, während keiner der Patienten mit einer stabilen Erkrankung eine homozygote Mutation aufwies (p-Wert 0,0139). Bei den heterozygoten Genvarianten konnte hingegen keine Assoziation mit dem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden, so zeigten drei heterozygote Mutationsträger einen Progress während zwölf heterozygote Mutationsträger einen stabilen Krankheitsverlauf aufwiesen. Bei zwölf Patienten ohne Mutation wurde ein Progress der Leberzirrhose beschrieben und 17 zeigten kein Fortschreiten der Erkrankung.



**Abbildung 11:** Darstellung des Einflusses der ermittelten TCAB1-Genvarianten auf den Krankheitsverlauf.

Aus diesen gewonnenen Daten lässt sich eine neue Grafik ableiten, die ebenfalls den Verlauf der Erkrankung im Zusammenhang mit dem Auftreten von Einzelnukleotidpolymorphismen verdeutlicht. Wie Abbildung 12 zeigt, konnte bei 100 % der Patienten mit homozygoten Einzelnukleotidpolymorphismen ein Progress der Leberzirrhose festgestellt werden. Bei Patienten mit heterozygoten TCAB1-Polymorphismen zeigte sich in 20 % ein Progress, während bei Patienten mit der

TCAB1-Wildtypsequenz in 41 % der Fälle ein Fortschreiten der Erkrankung beobachtet werden konnte.

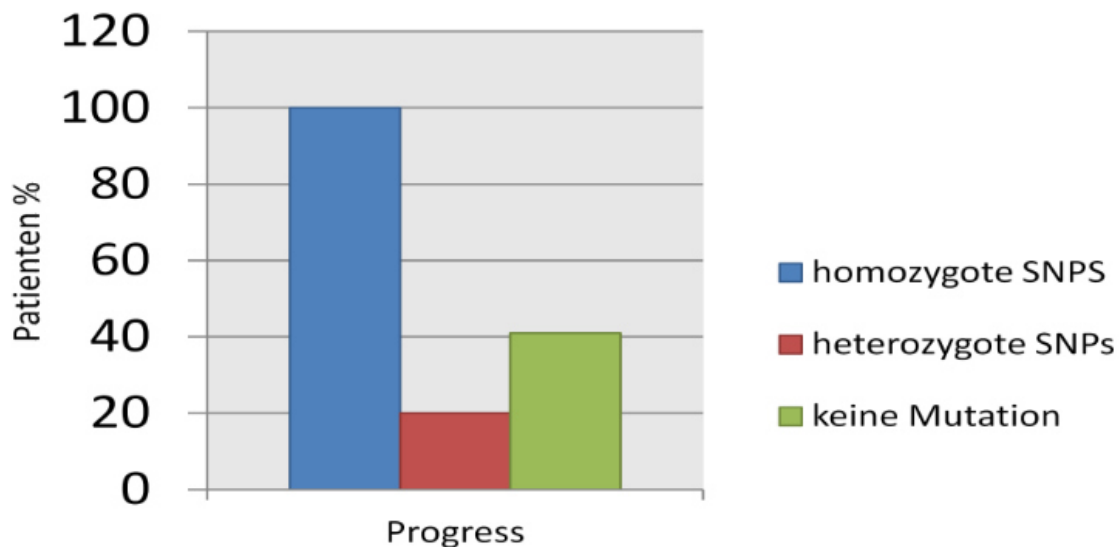


Abbildung 12: Einfluss von TCAB1-Genvarianten auf den Krankheitsverlauf (Darstellung in Prozent der Patienten, die einen Progress der Erkrankung zeigten).

Nachfolgend wurden die klinischen Daten im Hinblick auf die Lebenserwartung der Patienten untersucht. Es wurde verglichen, welche Patienten im Rahmen einer Verlaufskontrolle noch am Leben waren und welche bereits verstorben bzw. Lebertransplantiert werden mussten.

Abbildung 13 stellt die Überlebensrate der Patienten nach einem Follow-up im Zusammenhang mit den identifizierten Polymorphismen dar. Drei Patienten mit homozygoter Genvariante starben im Laufe des Follow-ups, lediglich einer überlebte. Die übrigen elf Patienten, die verstarben, waren entweder heterozygote Mutationsträger oder wiesen keine Mutationen auf. 33 dieser Patienten lebten noch während des Follow-ups. Diese Daten zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen homozygoten Einzelnukleotidpolymorphismen und dem Tod der betroffenen Patienten ( $p = 0,0352$ ).

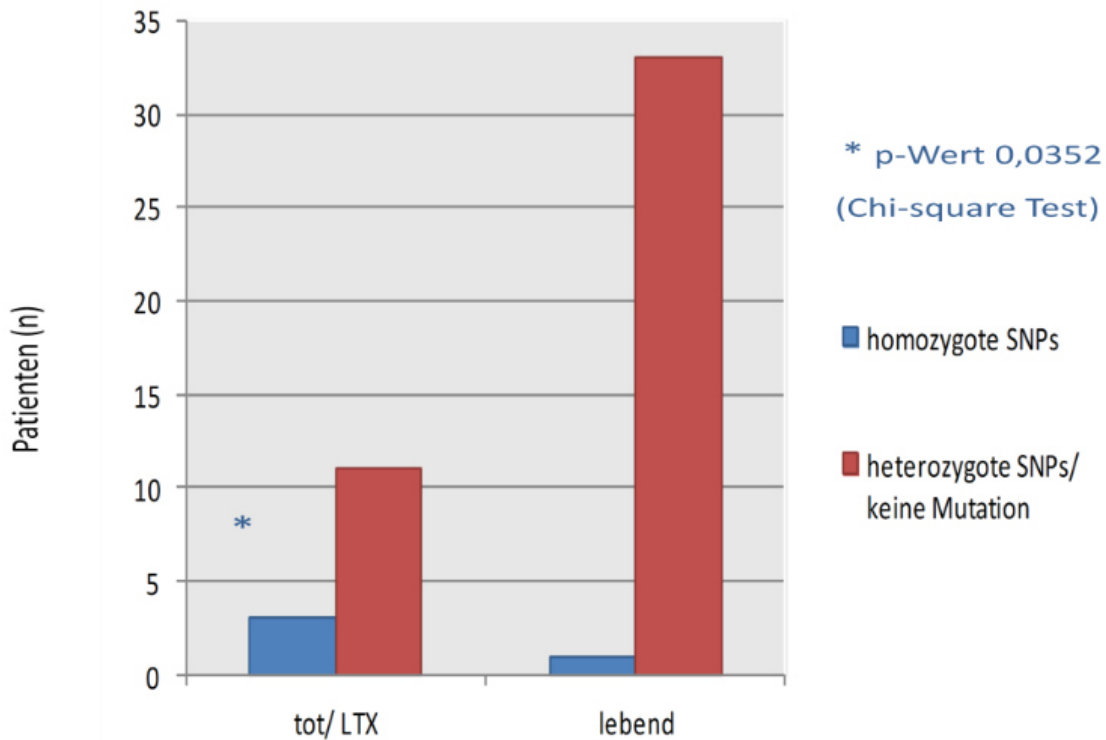


Abbildung 13: Einfluss der TCAB1-Genvarianten auf das Überleben.

Eine prozentuale Darstellung des Überlebens in Zusammenhang mit dem Auftreten von TCAB1-Genvarianten wird in Abbildung 14 wiedergegeben. Hier zeigt sich, dass 75 % der homozygoten Mutationsträger im Laufe des Follow-ups verstarben, während 25 % der heterozygoten Mutationsträger noch lebten. 75 % der Patienten mit heterozygoten SNPs oder keiner Mutation waren noch am Leben, 25 % mit homozygoten Mutationen waren verstorben. Dies verdeutlicht erneut, dass homozygote Mutationsträger einen ungünstigeren Krankheitsverlauf vorweisen.

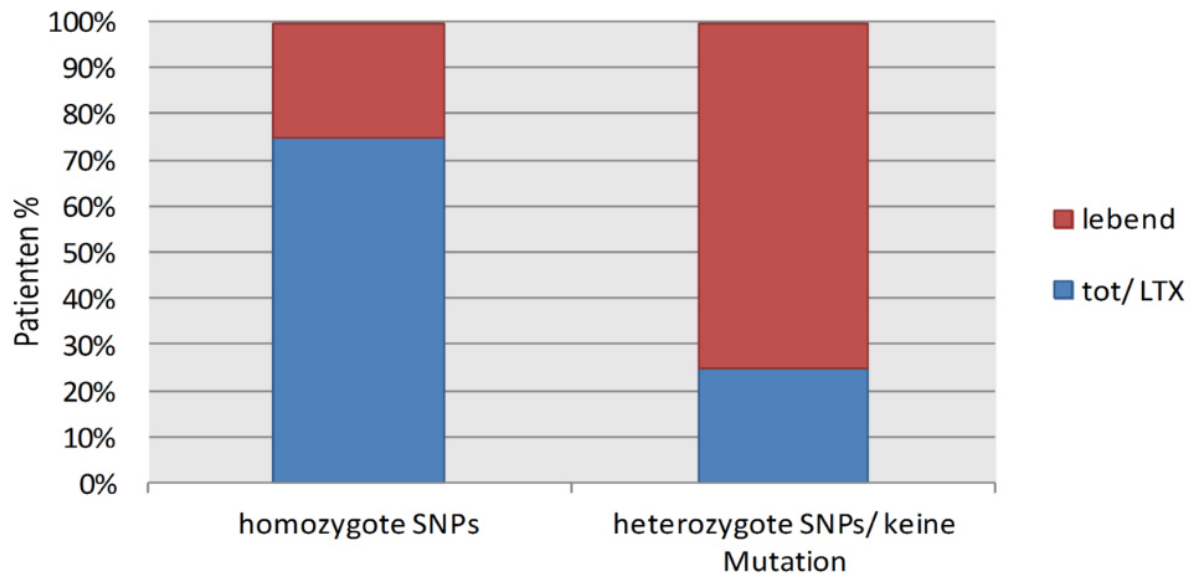


Abbildung 14: Einfluss von TCAB1-Genvarianten auf das Überleben (Darstellung in Prozent der Patienten).

### 3.5 Identifizierung einer neuen heterozygoten Mutation in der HCV-Studiengruppe

Die komplette Sequenz, der dreizehn TCAB1-Exons inklusive 3'UTR wurde ebenfalls in der Gruppe der 48 Patienten mit HCV-induzierter Leberzirrhose analysiert. In diesem Zusammenhang konnte eine Mutation identifiziert werden, die nicht in der SNP Database des NCBI aufgeführt wird. Diese Nukleotidvariante (c.663G>A, p.V221V) befindet sich in Exon 4 und trat bei einem Patienten auf (Allelhäufigkeit von 0,010 in der untersuchten Studiengruppe). Die neu identifizierte Mutation ist charakterisiert durch einen Basenaustausch von Guanin durch Adenin. Das Basentriplet GTG wird somit zum Basentriplet GTA (c.663G>A, p.V221V). Da beide Basentriplets für die Aminosäure Valin kodieren kommt es zu keinem Aminosäureaustausch. Weder in der EtOH-Studiengruppe noch in der Kontrollkohorte konnte diese Nukleotidvariante nachgewiesen werden (siehe hierzu Tabelle 11).

Abbildung 15 zeigt die Chromatogramme der identifizierten Nukleotidvariante.

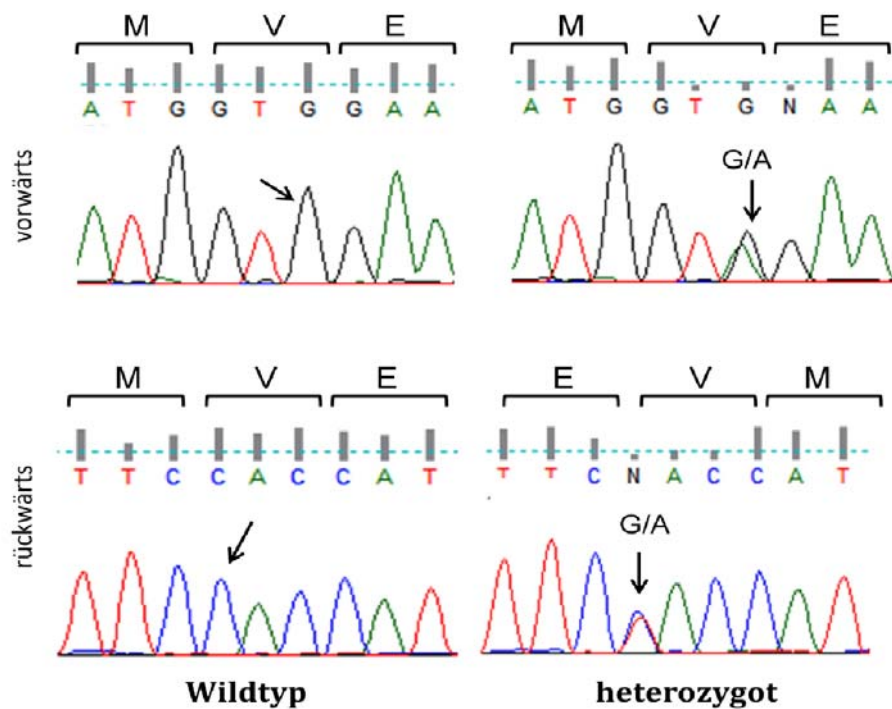


Abbildung 15: Chromatogramm der neu identifizierten Nukleotidvariante c.663G>A, p.V221V. Die Abbildung zeigt die Chromatogramme der erstmals identifizierten TCAB1-Nukleotidsequenzvariante c.663G>A, p.V221V eines Patienten der HCV-Studiengruppe. Dargestellt ist die heterozygote Variante in je Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz. Ebenfalls abgebildet ist die zugehörige Wildtypsequenz. Über den eckigen Klammern ist die zum Basentriplet gehörige Aminosäure im Einbuchstabencode angegeben.

### 3.6 Die Mutation c.663G>A ist assoziiert mit dem Progress HCV-induzierter Leberzirrhose

Die identifizierte TCAB1-Nukleotidvariante c.663G>A wurde bei einem 44 Jahre alten, männlichen HCV-infizierten Patienten kaukasischer Abstammung identifiziert. Die Dauer der Infektion (Zeitraum zwischen möglicher Erstinfektion mit dem HCV-Virus und der durch eine Leberbiopsie gesicherten Diagnose der Leberzirrhose) betrug bei den 48 Patienten der HCV-Studiengruppe im Durchschnitt 23 Jahre. Der Zeitraum zwischen Erstinfektion und Diagnosestellung betrug bei dem Patienten mit der genannten Nukleotidvariante c.663G>A mit 10 Jahren deutlich weniger als die

---

Hälfte der Durchschnittszeit dieser Studiengruppe. Der Patient zeigte somit einen deutlich schnelleren Verlauf der Erkrankung.

### 3.7 Der Einzelnukleotidpolymorphismus c.936C>T ist assoziiert mit dem Progress der Alkohol-induzierten Leberzirrhose

Der heterozygote Einzelnukleotidpolymorphismus c.936C>T p.C312C (Referenznummer rs73248508 laut SNP Database des NCBI) tritt in der EtOH-Gruppe mit einer Allelfrequenz von 0,010 auf und wurde in keiner der beiden anderen Patientengruppen identifiziert (siehe Tabelle 11). Dieser Polymorphismus wurde bei einem männlichen, 41 Jahre alten Patienten afrikanischer Abstammung identifiziert. Klinisch wurde bei diesem Patienten ein Progress der Leberzirrhose festgestellt.

### 3.8 Signifikant erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Einzelnukleotidpolymorphismen bei afrikanischen Patienten mit Alkohol-induzierter Leberzirrhose

Das Vorkommen der Einzelnukleotidpolymorphismen ist innerhalb der Gruppe der ethyltoxisch bedingten Leberzirrhosen bei Patienten mit afrikanischer Herkunft signifikant erhöht (siehe hierzu Tabelle 12).



**Tabelle 10:** Vergleich der Häufigkeit identifizierter TCAB1-Genvarianten (Exons 1-10 und 3'UTR) in der Studiengruppe der alkoholbedingten Leberzirrhosen zwischen Patienten afrikanischer und kaukasischer Abstammung. Die Tabelle zeigt die Nukleotidvariante sowie die Aminosäurevariante (dargestellt im Einbuchstabencode), die Anzahl der Homozygoten und der Heterozygoten, Allelfrequenz sowie p-Wert berechnet nach dem exakten Fischer's Test.

Gen- abschnitt	Nukleotid- variante	Amino- säure- variante	Studiengruppe EtOH Afrikaner (n=4)	Studiengruppe EtOH Kaukasier (n=44)	Exakter Fisher's Test
			Anzahl heterozygote; Anzahl homozygote (Allelfrequenz)		p-Wert
3'UTR	r. 56G>C	---	1;0 (0,125)	1;0 (0,011)	n.s.
TCAB1	c.202C>G	p.R68G	3;1 (0,625)	7;0 (0,080)	0,0006
	c.450C>T*	p.F150F	1;0 (0,125)	5;0 (0,057)	n.s.
	c.936C>T*	p.C312C	1;0 (0,125)	0	n.s.
	c.1308T>C*	p.A436A	1;0 (0,125)	0	n.s.
	c.1565C>G	p.A522G	3;1 (0,625)	9;3 (0,170)	0,0091
	c.1566G>A*	p.A522A	0	1;0 (0,011)	n.s.
<b>Gesamt</b>			<b>10;2 (0,135)</b>	<b>23;3 (0,025)</b>	<b>&lt;0.0001</b>

Zwei der identifizierten Nukleotidvarianten (c.202C>G pR68G und c.1565C>G p.A522G) traten bei den afrikanischen Patienten signifikant häufiger auf als bei den Patienten kaukasischer Abstammung. Insgesamt zeigten die afrikanischen Patienten eine signifikant erhöhte Allelfrequenz der identifizierten SNPs innerhalb der EtOH-Gruppe. Bei vier Individuen wurden zehn heterozygote und zwei homozygote Nukleotidvarianten (Allelfrequenz 0.135) entdeckt. Bei den 44 Patienten kaukasischer Abstammung wurden 23 heterozygote und drei homozygote SNPs gefunden

(Allelfrequenz 0,025; p-Wert < 0,0001). Insgesamt konnten bei allen vier Patienten afrikanischer Abstammung mehrere SNPs nachgewiesen werden. Bei fünfzehn der 44 Patienten kaukasischer Abstammung konnte man TCAB1-Nukleotidvarianten feststellen, während 29 keine Mutation aufwiesen.

Abbildung 16 gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung von Mutationsträgern innerhalb der Studiengruppe. Es wurden bei 100 % der Patienten afrikanischer Abstammung Einzelnukleotidpolymorphismen identifiziert. Bei den kaukasischen Patienten konnten in nur 34 % der Fälle SNPs nachgewiesen werden, sechsundsechzig wiesen keine Sequenzvarianten auf (p-Wert=0,0199 nach Fisher).

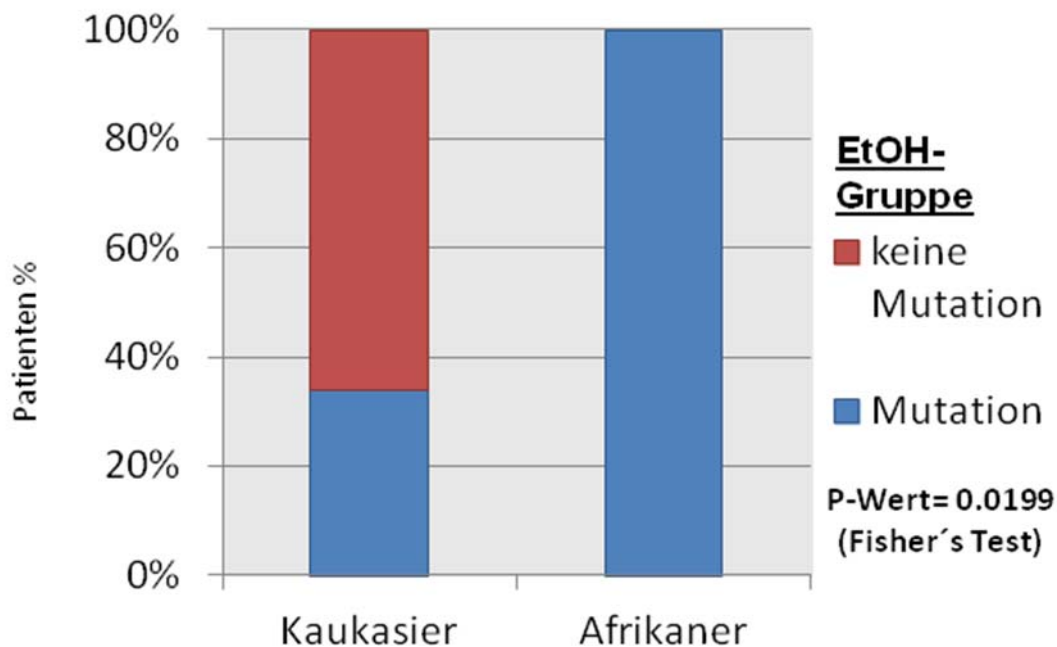


Abbildung 16: Darstellung der Mutationsträger in der EtOH-Gruppe in Abhängigkeit von der Ethnizität der Patienten (Darstellung in Prozent der Patienten).

---

### 3.9 Erhöhtes Vorkommen von Einzelnukleotidpolymorphismen bei Patienten asiatischer und afrikanischer Abstammung

Die Nukleotidvarianten r. 56G>C; c.202C>G p.R68G; c.450C>T p.F150F; c.1308T>C p.A436A; c.1565C>G p.A522G konnte bei Patienten asiatischer und afrikanischer Abstammung signifikant häufiger nachgewiesen werden als bei Patienten kaukasischen Ursprungs. Insgesamt wurden bei den asiatischen und afrikanischen Patienten siebzehn heterozygote und acht homozygote Nukleotidvarianten entdeckt (Allelfrequenz 0.126). Bei den Patienten kaukasischer Abstammung wurden neunzig heterozygote und vierzehn homozygote Polymorphismen identifiziert (Allelfrequenz 0.034; p-Wert 0.001). Die Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Verteilung der Einzelnukleotidpolymorphismen in Bezug auf die einzelnen Ethnizitäten.

**Tabelle 11:** Vergleich der Häufigkeit identifizierte TCAB1-Genvarianten (Exons 1-10 und 3'UTR) zwischen Patienten asiatischer und afrikanischer sowie kaukasischer Abstammung. Die Tabelle zeigt die Nukleotid- und Aminosäurevariante, die Anzahl der Homozygoten und der Heterozygoten, Allelfrequenz sowie p-Wert berechnet nach dem exakten Fischer's Test.

Gen- abschnitt	Nukleotid- variante	Aminosäure- variante	Afrikaner Asiaten (n=10)	Kaukasier (n=134)	Exakter Fisher's Test p-Wert
			Anzahl homozygote; Anzahl heterozygote (Allelfrequenz)		
3'UTR	r. 56G>C	---	1;1 (0,15)	5;1 (0,026)	0,025
TCAB1	c.202C>G	p.R68G	4;3 (0,5)	25;3 (0,116)	0,0001
	c.450C>T*	p.F150F	4;0 (0,2)	14;1 (0,060)	0,0398
	c.663G>A*	p.V221V	0	1;0 (0,004)	n.s
	c.919C>T	p.R307W	0	1;0 (0,004)	n.s
	c.936C>T*	p.C312C	1;0 (0,05)	0	n.s
	c.1308T>C*	p.A436A	2;0 (0,01)	1;0 (0,004)	0,0132
	c.1565C>G	p.A522G	5;4 (0,65)	41;9 (0,020)	0,0001
	c.1566G>A*	p.A522A	0	2;0 (0,007)	n.s
Gesamt			17;8 (0,126)	90;14 (0,034)	< 0,0001

---

## **4 Diskussion**

### **4.1 Auswertung Mutationsanalyse**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 3.744 DNA-Sequenzen untersucht, mit dem Ziel, mögliche Nukleotidvarianten des Gens TCAB1 bei Patienten mit nachgewiesener Leberzirrhose zu identifizieren und die Allelfrequenz mit einer gesunden Kontrollkohorte zu vergleichen.

Es wird vermutet, dass die Prävalenz der Leberzirrhose in der westlichen Bevölkerung etwa ein Prozent beträgt [85]. Die Ursachen, die zu einer Entstehung einer Leberzirrhose führen, sind vielfältig (siehe Tabelle 1). Etwa 5 % der betroffenen Patienten weisen keine nachweisbaren Risikofaktoren auf [92]. Darüber hinaus zeigen Patienten mit identischen Risikofaktoren oftmals unterschiedlichste klinische Manifestationen [92]. Chaiteerakij und Roberts vermuten daher eine mögliche genetische Prädisposition, die die Entstehung einer Leberzirrhose begünstigen könnte [92]. Im Jahr 2011 gelang den Arbeitsgruppen um Hartmann et al. und Calado et al. erstmals der Nachweis einer direkten Assoziation von Mutationen in den TERT- und TERC-Genen des Telomerase-Komplexes mit der Entstehung einer Leberzirrhose [17].

Bei TCAB1 handelt es sich um eine weitere eingelagerte Proteinkomponente des Telomerase-Komplexes. Zhong et al. untersuchten in einer Studie zahlreiche TCAB1-Sequenzen bei Patienten mit DC [55]. Sie ermittelten Missense-Mutationen bei einer autosomal-rezessiven Form der klassischen DC [55]. Diese Mutationen in den Exons 2, 8, 7 und 9 von DC-Patienten konnten bei keinem der 380 Patienten der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass es sich nicht um Polymorphismen handelt [55]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen zu erheblichen Störungen beim intrazellulären Transport der Telomerase führen [55].

In der vorliegenden TCAB1-Sequenzanalyse wurden insgesamt neun verschiedene Nukleotidvarianten identifiziert (siehe Tabelle 11). Sieben Varianten waren laut SNP Database des NCBI bereits vorbeschrieben. Unter Anwendung des exakten Tests nach Fisher wurde aus der Allelfrequenz der Nukleotidvarianten in den Kontroll- und

Studiengruppen die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) ermittelt. Der Signifikanzwert lag zwischen 0,05 und 1 und kann somit als nicht signifikant angenommen werden. Die Prävalenz von TCAB1-Sequenzvarianten kann somit nicht mit der Studien- bzw. der Kontrollgruppe assoziiert werden. Es sollte in diesem Zusammenhang jedoch erwähnt werden, dass die Patientenzahl anderer Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit häufig deutlich höher ausfielen. Entsprechend wurden von Hartmann et al. insgesamt 1.121 Individuen rekrutiert [17]. die Patientenkohorte der Studie von Schildkraut et al. umfasste zudem weit mehr als 16.800 Probanden [110]. Es ist daher vorstellbar, dass durch eine Vergrößerung der Patientenzahl der Studien- und Kontrollgruppe ein signifikanter p-Wert ermittelt und ein erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Mutationen bei Leberzirrhotikern nachgewiesen werden könnte.

Bei drei der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Genvarianten führt der Austausch einer Base zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz: p.R68G; p.R307W; p.A522G. Die Variante p.R68G ist in der Kontrollgruppe häufiger zu finden (Allelfrequenz Kontrollgruppe 0,167, EtOH-Gruppe 0,125, HCV-Gruppe 0,104). Die Variante p.A522G kam hingegen häufiger in der HCV-Studiengruppe vor (Allelfrequenz Kontrollgruppe 0,24, EtOH-Gruppe 0,208, HCV-Gruppe 0,323), während p.R307W ausschließlich in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedlichen Prävalenzen der TCAB1-Varianten in den entsprechenden Kohorten stehen nicht zwangsläufig im Widerspruch zueinander. Es ist durchaus denkbar, dass bestimmte Genvarianten einen positiven Effekt auf die Aktivität der Telomerase ausüben und den Patienten somit möglicherweise vor einer Krankheitsentstehung schützen [100].

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass eine identifizierte Genvariante einen negativen Effekt auf die Entstehung und den Verlauf einer Krankheit ausübt. Der Einzelnukleotidpolymorphismus c.936C>T p.C312C kam lediglich einmal in der EtOH-Studiengruppe vor (Allelfrequenz 0.010). In der Gruppe der HCV-infizierten Patienten oder der Kontrollkohorte konnte er nicht nachgewiesen werden. Anhand der klinischen Daten zeigte sich bei dem Patienten ein Progress der Leberzirrhose. Bereits in früheren Studien konnte das Auftreten von Genvarianten, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnten, in den Zusammenhang mit der begünstigten Entstehung von Krankheiten gebracht werden [110, 111]. Schildkraut et

al. konnten den Einzelnukleotidpolymorphismus rs2287498 (c.450C>T p.F150F) mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms in Verbindung bringen [110]. Diesen Polymorphismus ermittelten wir insgesamt sechsmal in der Gruppe der ethyltoxisch bedingten Leberzirrhosen (Allelfrequenz 0,063), siebenmal in der Gruppe der HCV-induzierten Leberzirrhosen (0,073) und sechsmal in der Kontrollgruppe (0,073). In einer Studie von Garcia-Closas und Kollegen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus rs2287499 (c.202C>G p.R68G) und dem Auftreten von Mammakarzinomen beschrieben [111]. Diesen SNP konnten wir ebenfalls mit einer Allelfrequenz von 0,125 in der EtOH-Gruppe, 0,104 in der HCV-Gruppe und 0,167 in der Kontrollgruppe identifizieren. Zwar wurde der SNP in der vorliegenden Arbeit in der Kontrollgruppe häufiger identifiziert, dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Daten. Es ist vorstellbar, dass ein Polymorphismus auf die Entstehung einer Krankheit oder deren Verlauf einen negativen Einfluss hat, während er auf eine andere Erkrankung einen positiven Effekt ausübt. Mangels Signifikanz der ermittelten Werte ist es in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich auf eine positive oder negative Assoziation zwischen dem Vorkommen von Sequenzvarianten und der Zugehörigkeit eines Patienten zur gesunden Kontroll- oder zirrhotischen Studiengruppe zu schließen.

#### 4.2 Korrelation klinischer Daten innerhalb der Gruppe Alkohol-induzierter Leberzirrhosen mit dem Auftreten homozygoter SNPs

In zahlreichen vorangegangenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen spezifischen chromosomalen Loci und Lebererkrankungen untersucht [100, 112, 113]. Beispielsweise analysierten Stickel et al. das PNPLA3-Gen in einer Kohorte alkoholabhängiger kaukasischer Patienten mit ethyltoxisch-bedingter Leberzirrhose [100]. Hierbei gelang es ihnen, einen Zusammenhang zwischen der Nukleotidvariante rs738409 des PNPLA3-Gens und dem Auftreten alkoholischer Leberzirrhose zu ermitteln [100]. Romeo und Kollegen untersuchten Nukleotidvarianten des Gens PNPLA3 an Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber und konnten mit der Allelvariante rs738409(G) einen 2-fach höheren Fettgehalt der Leber sowie erhöhte hepatische Entzündungsparameter assoziieren [113]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen einerseits, dass die Ausprägung alkoholbedingter

---

Erkrankungen zum Teil genetischen Faktoren zugeschrieben werden kann und andererseits, dass ein homozygoter Genotyp möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat als eine heterozygote Variante.

Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der eine Kohorte von 48 Patienten mit alkoholbedingter Leberzirrhose auf Nukleotidvarianten des Gens TCAB1 untersucht wurde. Der Vergleich der Allelfrequenzen zwischen der Studiengruppe und der Kontrollgruppe ergab zwar keine signifikanten Werte, jedoch zeigten Träger homozygoter Nukleotidvarianten im Vergleich zu Patienten der gleichen Studiengruppe mit heterozygoten Nukleotidvarianten oder keiner Mutation signifikante Unterschiede im klinischen Verlauf ( $p=0.0139$ ). Die homozygoten Varianten betrafen die Allele c.202C>G p.R68G und c.1565C>G p.A522G. In beiden Fällen führte dies zu einem Austausch der Aminosäuren. Patienten, bei denen eine Homozygotie in den betreffenden Allelen nachgewiesen werden konnte, zeigten einen schnelleren Progress der Erkrankung als Patienten mit Heterozygotie des jeweiligen Allels oder keiner Nukleotidvariante (siehe Abbildungen 11 und 12). Eine deutliche Signifikanz ergab sich zudem beim Vergleich der Überlebensraten der Patienten ( $p=0,0352$ ). 75% der Patienten mit homozygoten Allelvarianten verstarben, während lediglich 25% überlebten (siehe Abbildung 14). Diese Daten sind möglicherweise ein weiterer Hinweis auf den möglichen Einfluss genetischer Varianten auf den Krankheitsverlauf der ethyltoxischen Leberzirrhose. Höchstwahrscheinlich spielt in diesem Zusammenhang der TCAB1-Genotyp eine entscheidende Rolle. Da bei Vorliegen einer Homozygotie ausschließlich die Nukleotidvariante transkribiert wird, ist davon auszugehen, dass der negative Einfluss der Genveränderung auf die Telomeraseaktivität und proliferative Kapazität größer ist als bei Vorliegen einer Heterozygotie. Es bleibt in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass bei lediglich vier Patienten der EtOH-Gruppe Homozygotien identifiziert werden konnten, während in der Kontrollgruppe ähnliche Allelfrequenzen auftraten. Bei dem Vergleich der Allelfrequenzen zwischen den beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Daher kann die Frage, ob homozygote Allelvarianten einen schnelleren Progress der Alkohol-induzierten Leberzirrhose zur Folge haben anhand der vorliegenden Daten nicht hinreichend beantwortet werden.



### 4.3 Die Einzelnukleotidvariante 663G>A in der Gruppe der HCV-induzierten ist assoziiert mit dem Progress einer Leberzirrhose

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem die TCAB1-DNA-Sequenzen von 48 HCV-infizierten Patienten mit dem Nachweis einer Leberzirrhose analysiert. Das Vorliegen einer chronischen HCV-Infektion gilt als eine der Hauptursachen für die Entstehung chronischer Lebererkrankungen, der Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom [114]. Zahlreiche Studien belegen, dass nur ein Teil der chronisch infizierten HCV-Patienten an einer Leberzirrhose erkranken und hierbei deutliche interindividuelle Schwankungen in Verlauf und Ausprägung auftreten können [115]. Diese Tatsache lässt auf eine genetische Komponente schließen, die den Grad der Erkrankung beeinflusst [114]. Dass Einzelnukleotidpolymorphismen mit dem Fortschreiten einer Leberfibrose bei HCV-infizierten Patienten assoziiert werden können, wurde inzwischen durch mehrere Studien belegt [114, 116, 117]. Huang und Kollegen beschrieben den Zusammenhang zweier Polymorphismen mit fortgeschrittener Leberfibrose bei HCV-infizierten Patienten [118]. In einer später durchgeführten Studie erstellten sie einen aus sieben Einzelnukleotidpolymorphismen bestehenden Algorithmus zur Ermittlung des genetischen Risikos der Entwicklung einer Leberfibrose bzw. -zirrhose bei gleichzeitiger chronischer HCV-Infektion [119]. Diese Daten zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Einzelnukleotidvarianten bei HCV-infizierten Patienten und einem Progress der Lebererkrankung.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Genvariante innerhalb der HCV-Gruppe identifiziert werden, die in der SNP Database des NCBI nicht gelistet war. Bei diesem Polymorphismus c.663G>A p.V221V (Allelfrequenz 0.010) kommt es nicht zu einem Austausch der Aminosäure. Bei keinem Patienten der EtOH-Gruppe oder Kontrollkohorte wurde diese Genvariante identifiziert. Da bei dem betroffenen Patienten laut klinischer Daten ein deutlich schnellerer Progress der Leberzirrhose beschrieben wird, wäre zu vermuten, dass der Basenaustausch einen negativen Effekt auf das Protein hat, obwohl es zu keiner Veränderung der Aminosäure kommt. Dies wäre zu erklären durch ein verändertes Spleißverhalten, welches durch den Basenaustausch verursacht wird. Im Vergleich zu den beiden anderen Patientengruppen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, sodass anhand dieser Daten eine Aussage rein spekulativ wäre. Weitere

---

Analysen wären notwendig, um die Auswirkungen auf das Spleißverhalten bei dem Basenaustausch c.663G>A zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie gelang uns der erstmalige Nachweis dieser Mutation c.663G>A

#### 4.4 Polymorphismen in Abhängigkeit von der Ethnizität

Die Prävalenz von Polymorphismen in Lebererkrankungen zeigt deutliche ethnische Unterschiede [112, 113, 120] und die Ethnizität wurde bereits in früheren Studien mit einem Progress der Lebererkrankung bei HCV-infizierten Patienten in Verbindung gebracht [114, 121]. Darüber hinaus wurde eine polymorphe Telomerase-Mutation kürzlich in Zusammenhang mit Patienten afrikanischer Herkunft beschrieben [122]. Diese Studien sind ein eindeutiges Indiz dafür, dass Polymorphismen innerhalb ethnischer Gruppen unterschiedlich häufig auftreten und dass diese Gruppen wiederum verschiedene Prädispositionen gegenüber bestimmten Erkrankungen aufweisen können.

Die vorliegenden Daten zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen bestimmten TCAB1-Polymorphismen und Patienten afrikanischer Herkunft. Beim Vergleich von Afrikanern der EtOH-Gruppe mit kaukasischen Patienten derselben Studiengruppe konnte ein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz der Nukleotidvarianten c.202C>G p.R68G und c.1565C>G p.A522G ermittelt werden (vgl. Tabelle 12). In der EtOH-Gruppe konnten 100 % der Patienten afrikanischer Herkunft als Mutationsträger identifiziert werden, während lediglich 34 % der kaukasischen Patienten die Genvariante aufwiesen (Abbildung 16). Da bei beiden Nukleotidvarianten der Basenaustausch einen Aminosäureaustausch bedingt, ist es vorstellbar, dass diese Mutation durch Veränderung der Proteininformation afrikanische Patienten mit chronischem Alkoholabusus für eine Leberzirrhose prädisponiert. Es muss in diesem Zusammenhang zudem angemerkt werden, dass bei Patienten afrikanischer Herkunft Einzelnukleotidpolymorphismen signifikant häufiger identifiziert werden konnten (Allelfrequenz Afrikaner 0,126, Kaukasier 0,034; p-Wert < 0,0001, siehe Tabelle 12). Aufgrund der deutlichen Überrepräsentation der Kaukasier in allen drei Gruppen (siehe Kapitel 3.1) kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob Patienten afrikanischer Herkunft eine Prädisposition

---

aufweisen bei chronischem Alkoholmissbrauch rascher an einer Leberzirrhose zu erkranken.

#### 4.5 Ausblick

Zahlreiche genetische Studien umfassen deutlich größere Patientenkohorten als die Kohorte der vorliegenden Arbeit. Es ist daher vorstellbar, dass durch eine Vergrößerung der Patientenzahl der Studien- und Kontrollgruppe möglicherweise ein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz erzielt und ein erhöhtes Vorkommen von TCAB1-Mutationen bei Leberzirrhosepatienten nachgewiesen werden kann. In zukünftigen Studien sollten zudem funktionelle Analysen identifizierter TCAB1-Mutationen durchgeführt werden, wie eine Längenanalyse der Telomere oder Nachweis der Telomeraseaktivität [123]. Dies gilt insbesondere für die Allelvarianten 663G>A und c.936C>T, die klinisch mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf assoziiert zu sein scheinen. Im Hinblick auf die Ethnizität im Zusammenhang mit TCAB1-Mutationen bei Leberzirrhosepatienten wäre es sinnvoll, Patientenkohorten mit ausgeglichener ethnischer Zusammensetzung zu rekrutieren.

## **5 Zusammenfassung**

Der Telomerase-Enzymkomplex übt eine stabilisierende Wirkung auf die regenerative Kapazität von somatischen Zellen aus. Dies geschieht durch das Anhängen von DNA-Sequenzen an die Telomere und somit die Verhinderung der Seneszenz. Telomerase-Mutationen konnten bereits mit der Entstehung von Erkrankungen, wie Dyskeratosis Congenita, aplastischer Anämie oder Leberzirrhose, assoziiert werden. Aufgrund der Hypothese, dass TCAB1-Mutationen die Telomeraseaktivität hemmen und die regenerative Kapazität der Hepatozyten negativ beeinflussen, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Sequenzen für das TCAB1-Gen von je 48 Patienten mit Hepatitis-C-induzierter, je 48 Patienten mit ethyltoxisch-bedingter Leberzirrhose sowie 48 gesunden Probanden analysiert. Nach Auswertung von insgesamt 3.744 DNA-Sequenzen konnten neun verschiedene Nukleotidvarianten ermittelt werden. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen der Studien- und Kontrollgruppen, jedoch wurden mögliche Zusammenhänge von homozygoten Mutationsträgern innerhalb der EtOH-Gruppe und einem ungünstigeren Verlauf der Leberzirrhose aufgezeigt (p-Wert 0,0139). Des Weiteren gelang die Erstbeschreibung der Nukleotidvariante c.663G>A p.V221V in der HCV-Gruppe (Allelfrequenz 0,010), die mit einem rascheren Progress der Leberzirrhose in Verbindung zu stehen scheint und weder in der EtOH- noch in der Kontrollgruppe vorkam. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen einem gehäuften Vorkommen von Polymorphismen in der EtOH-Gruppe bei Patienten afrikanischer Herkunft im Vergleich zu Patienten kaukasischer Herkunft der gleichen Gruppe (p-Wert <0,0001) ermittelt werden. Bei Betrachtung aller Studiengruppen wurden Einzelnukleotidpolymorphismen bei afrikanischen Patienten häufiger als bei kaukasischen Patienten (p-Wert < 0,0001) identifiziert. Zudem sollte die Anzahl der Patienten innerhalb der Kohorten deutlich vergrößert werden, um eventuell signifikante Ergebnisse im Vergleich der Allelfrequenz zwischen Studien- und Kontrollgruppen zu erhalten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind der erste experimentelle Beweis, dass TCAB1-Mutationen bei einem Teil der Patienten mit chronischen Lebererkrankungen vorliegen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TCAB1-Mutationen zu einem schnelleren Verlauf der Zirrhose und eine erhöhte Sterberate bei Patienten mit

ethyltoxischer Leberzirrhose führen. Diese Arbeit liefert einen ersten Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in der Behandlung oder Prävention der Leberzirrhose.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. Cell, 2001. **106**(6): p. 661-73.
2. Blackburn, E.H., *Telomeres*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(10): p. 378-81.
3. Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti, *Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity*. EMBO J, 1992. **11**(5): p. 1921-9.
4. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere diseases*. N Engl J Med, 2009. **361**(24): p. 2353-65.
5. Rudolph, K.L., D. Hartmann, and O.G. Opitz, *Telomere dysfunction and DNA damage checkpoints in diseases and cancer of the gastrointestinal tract*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 754-62.
6. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
7. Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.R. Wu, *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6622-6.
8. Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange, *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell, 1999. **97**(4): p. 503-14.
9. Lechel, A., M.P. Manns, and K.L. Rudolph, *Telomeres and telomerase: new targets for the treatment of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **41**(3): p. 491-7.
10. Palm, W. and T. de Lange, *How shelterin protects mammalian telomeres*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 301-34.
11. Kanoh, J. and F. Ishikawa, *Composition and conservation of the telomeric complex*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2295-302.
12. Baumann, P. and T.R. Cech, *Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1171-5.
13. Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, and T. de Lange, *Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 231-5.
14. Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst, and T. de Lange, *A human telomeric protein*. Science, 1995. **270**(5242): p. 1663-7.
15. Xin, Z.T., A.D. Beauchamp, R.T. Calado, J.W. Bradford, J.A. Regal, A. Shenoy, Y. Liang, P.M. Lansdorp, N.S. Young, and H. Ly, *Functional characterization of natural telomerase mutations found in patients with hematologic disorders*. Blood, 2007. **109**(2): p. 524-32.
16. Hande, M.P., E. Samper, P. Lansdorp, and M.A. Blasco, *Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 589-601.
17. Hartmann, D., U. Srivastava, M. Thaler, K.N. Kleinhan, G. N'Kontchou, A. Scheffold, K. Bauer, R.F. Kratzer, N. Kloos, S.F. Katz, Z. Song, Y. Begus-Nahrman, A. Kleger, G. von Figura, P. Strnad, A. Lechel, C. Gunes, A. Potthoff, K. Deterding, H. Wedemeyer, Z. Ju, G. Song, F. Xiao, S. Gillen, H. Schrezenmeier, T. Mertens, M. Ziol, H. Friess, M. Jarek, M.P. Manns, M. Beaugrand, and K.L. Rudolph, *Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1608-17.
18. Blasco, M.A., *Telomere length, stem cells and aging*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(10): p. 640-9.
19. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
20. Allsopp, R.C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E.V. Younglai, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley, *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10114-8.

21. Artandi, S.E. and R.A. DePinho, *A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(1): p. 39-46.
22. d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson, *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. *Nature*, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
23. Djojosebroto, M.W., Y.S. Choi, H.W. Lee, and K.L. Rudolph, *Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer*. *Mol Cells*, 2003. **15**(2): p. 164-75.
24. Wright, W.E. and J.W. Shay, *The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization*. *Exp Gerontol*, 1992. **27**(4): p. 383-9.
25. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Regulation of telomerase by telomeric proteins*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 177-208.
26. Cohen, S.B., M.E. Graham, G.O. Lovrecz, N. Bache, P.J. Robinson, and R.R. Reddel, *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. *Science*, 2007. **315**(5820): p. 1850-3.
27. Venteicher, A.S., E.B. Abreu, Z. Meng, K.E. McCann, R.M. Terns, T.D. Veenstra, M.P. Terns, and S.E. Artandi, *A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis*. *Science*, 2009. **323**(5914): p. 644-8.
28. Morin, G.B., *The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats*. *Cell*, 1989. **59**(3): p. 521-9.
29. Nugent, C.I. and V. Lundblad, *The telomerase reverse transcriptase: components and regulation*. *Genes Dev*, 1998. **12**(8): p. 1073-85.
30. Venteicher, A.S. and S.E. Artandi, *TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(9): p. 1329-31.
31. Wyatt, H.D., S.C. West, and T.L. Beattie, *InTERTpreting telomerase structure and function*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(17): p. 5609-22.
32. Fu, D. and K. Collins, *Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation*. *Mol Cell*, 2007. **28**(5): p. 773-85.
33. Venteicher, A.S., Z. Meng, P.J. Mason, T.D. Veenstra, and S.E. Artandi, *Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly*. *Cell*, 2008. **132**(6): p. 945-57.
34. Chiu, C.P., W. Dragowska, N.W. Kim, H. Vaziri, J. Yui, T.E. Thomas, C.B. Harley, and P.M. Lansdorp, *Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow*. *Stem Cells*, 1996. **14**(2): p. 239-48.
35. Norrback, K.F., M. Hultdin, K. Dahlenborg, P. Osterman, R. Carlsson, and G. Roos, *Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers*. *Eur J Haematol*, 2001. **67**(5-6): p. 309-17.
36. Maini, M.K., M.V. Soares, C.F. Zilch, A.N. Akbar, and P.C. Beverley, *Virus-induced CD8+ T cell clonal expansion is associated with telomerase up-regulation and telomere length preservation: a mechanism for rescue from replicative senescence*. *J Immunol*, 1999. **162**(8): p. 4521-6.
37. Martens, U.M., V. Brass, L. Sedlacek, M. Pantic, C. Exner, Y. Guo, M. Engelhardt, P.M. Lansdorp, C.F. Waller, and W. Lange, *Telomere maintenance in human B lymphocytes*. *Br J Haematol*, 2002. **119**(3): p. 810-8.
38. Hiyama, K., Y. Hirai, S. Kyoizumi, M. Akiyama, E. Hiyama, M.A. Piatyszek, J.W. Shay, S. Ishioka, and M. Yamakido, *Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells*. *J Immunol*, 1995. **155**(8): p. 3711-5.
39. Artandi, S.E. and R.A. DePinho, *Telomeres and telomerase in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 9-18.
40. Kojima, H., O. Yokosuka, F. Imazeki, H. Saisho, and M. Omata, *Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(2): p. 493-500.

41. Tahara, H., T. Nakanishi, M. Kitamoto, R. Nakashio, J.W. Shay, E. Tahara, G. Kajiyama, and T. Ide, *Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas*. *Cancer Res*, 1995. **55**(13): p. 2734-6.
42. Kotoula, V., P. Hytiroglou, A. Pyrpasopoulou, R. Saxena, S.N. Thung, and C.S. Papadimitriou, *Expression of human telomerase reverse transcriptase in regenerative and precancerous lesions of cirrhotic livers*. *Liver*, 2002. **22**(1): p. 57-69.
43. Hytiroglou, P., V. Kotoula, S.N. Thung, M. Tsokos, M.I. Fiel, and C.S. Papadimitriou, *Telomerase activity in precancerous hepatic nodules*. *Cancer*, 1998. **82**(10): p. 1831-8.
44. Nakashio, R., M. Kitamoto, H. Tahara, T. Nakanishi, T. Ide, and G. Kajiyama, *Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma*. *Int J Cancer*, 1997. **74**(2): p. 141-7.
45. Paradis, V., N. Youssef, D. Dargere, N. Ba, F. Bonvoust, J. Deschatrette, and P. Bedossa, *Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas*. *Hum Pathol*, 2001. **32**(3): p. 327-32.
46. Wiemann, S.U., A. Satyanarayana, M. Tsahuridu, H.L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, P. Flemming, S. Franco, M.A. Blasco, M.P. Manns, and K.L. Rudolph, *Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis*. *FASEB J*, 2002. **16**(9): p. 935-42.
47. Sahin, E. and R.A. Depinho, *Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 520-8.
48. Levy, M.Z., R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley, *Telomere end-replication problem and cell aging*. *J Mol Biol*, 1992. **225**(4): p. 951-60.
49. Meyerson, M., C.M. Counter, E.N. Eaton, L.W. Ellisen, P. Steiner, S.D. Caddle, L. Ziaugra, R.L. Beijersbergen, M.J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D.A. Haber, and R.A. Weinberg, *hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization*. *Cell*, 1997. **90**(4): p. 785-95.
50. Lingner, J., J.P. Cooper, and T.R. Cech, *Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?* *Science*, 1995. **269**(5230): p. 1533-4.
51. Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay, *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. *Science*, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
52. Ciocce, M. and A.I. Lamond, *Cajal bodies: a long history of discovery*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 105-31.
53. Cristofari, G., E. Adolf, P. Reichenbach, K. Sikora, R.M. Terns, M.P. Terns, and J. Lingner, *Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation*. *Mol Cell*, 2007. **27**(6): p. 882-9.
54. Deryusheva, S. and J.G. Gall, *Small Cajal body-specific RNAs of Drosophila function in the absence of Cajal bodies*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(24): p. 5250-9.
55. Zhong, F., S.A. Savage, M. Shkreli, N. Giri, L. Jessop, T. Myers, R. Chen, B.P. Alter, and S.E. Artandi, *Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita*. *Genes Dev*, 2011. **25**(1): p. 11-6.
56. Tycowski, K.T., M.D. Shu, A. Kukoyi, and J.A. Steitz, *A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles*. *Mol Cell*, 2009. **34**(1): p. 47-57.
57. Mahmoudi, S., S. Henriksson, L. Farnebo, K. Roberg, and M. Farnebo, *WRAP53 promotes cancer cell survival and is a potential target for cancer therapy*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e114.
58. Mitchell, J.R., J. Cheng, and K. Collins, *A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 567-76.
59. Matera, A.G., R.M. Terns, and M.P. Terns, *Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(3): p. 209-20.



60. Richard, P., X. Darzacq, E. Bertrand, B.E. Jady, C. Verheggen, and T. Kiss, *A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs*. EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4283-93.
61. Stern, J.L., K.G. Zyner, H.A. Pickett, S.B. Cohen, and T.M. Bryan, *Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(13): p. 2384-95.
62. Vulliamy, T.J., S.W. Knight, P.J. Mason, and I. Dokal, *Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(2): p. 353-7.
63. Armanios, M.Y., J.J. Chen, J.D. Cogan, J.K. Alder, R.G. Ingersoll, C. Markin, W.E. Lawson, M. Xie, I. Vulto, J.A. Phillips, 3rd, P.M. Lansdorp, C.W. Greider, and J.E. Loyd, *Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2007. **356**(13): p. 1317-26.
64. Calado, R.T., J. Brudno, P. Mehta, J.J. Kovacs, C. Wu, M.A. Zago, S.J. Chanock, T.D. Boyer, and N.S. Young, *Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1600-7.
65. Vulliamy, T., A. Marrone, I. Dokal, and P.J. Mason, *Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2168-70.
66. Walne, A.J. and I. Dokal, *Advances in the understanding of dyskeratosis congenita*. Br J Haematol, 2009. **145**(2): p. 164-72.
67. Dokal, I., *Dyskeratosis congenita in all its forms*. Br J Haematol, 2000. **110**(4): p. 768-79.
68. Heiss, N.S., S.W. Knight, T.J. Vulliamy, S.M. Klauck, S. Wiemann, P.J. Mason, A. Poustka, and I. Dokal, *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 32-8.
69. Knight, S.W., N.S. Heiss, T.J. Vulliamy, S. Greschner, G. Stavrides, G.S. Pai, G. Lestringant, N. Varma, P.J. Mason, I. Dokal, and A. Poustka, *X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(1): p. 50-8.
70. Vulliamy, T., A. Marrone, R. Szydlo, A. Walne, P.J. Mason, and I. Dokal, *Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 447-9.
71. Walne, A.J., T. Vulliamy, A. Marrone, R. Beswick, M. Kirwan, Y. Masunari, F.H. Al-Qurashi, M. Aljurf, and I. Dokal, *Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(13): p. 1619-29.
72. Vulliamy, T., R. Beswick, M. Kirwan, A. Marrone, M. Digweed, A. Walne, and I. Dokal, *Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(23): p. 8073-8.
73. Mitchell, J.R., E. Wood, and K. Collins, *A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 551-5.
74. Lee, J.J., H. Kook, I.J. Chung, J.A. Na, M.R. Park, T.J. Hwang, J.Y. Kwak, S.K. Sohn, and H.J. Kim, *Telomere length changes in patients with aplastic anaemia*. Br J Haematol, 2001. **112**(4): p. 1025-30.
75. Yamaguchi, H., R.T. Calado, H. Ly, S. Kajigaya, G.M. Baerlocher, S.J. Chanock, P.M. Lansdorp, and N.S. Young, *Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(14): p. 1413-24.
76. Ball, S.E., F.M. Gibson, S. Rizzo, J.A. Tooze, J.C. Marsh, and E.C. Gordon-Smith, *Progressive telomere shortening in aplastic anemia*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3582-92.
77. Leteurtre, F., X. Li, P. Guardiola, G. Le Roux, J.C. Sergere, P. Richard, E.D. Carosella, and E. Gluckman, *Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia*. Br J Haematol, 1999. **105**(4): p. 883-93.
78. Ly, H., R.T. Calado, P. Allard, G.M. Baerlocher, P.M. Lansdorp, N.S. Young, and T.G. Parslow, *Functional characterization of telomerase RNA variants found in patients with hematologic disorders*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2332-9.

79. Gross, T.J. and G.W. Hunninghake, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 517-25.
80. Tsakiri, K.D., J.T. Cronkhite, P.J. Kuan, C. Xing, G. Raghu, J.C. Weissler, R.L. Rosenblatt, J.W. Shay, and C.K. Garcia, *Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7552-7.
81. Lee, H.L., J.H. Ryu, M.H. Wittmer, T.E. Hartman, J.F. Lymp, H.D. Tazelaar, and A.H. Limper, *Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome*. Chest, 2005. **127**(6): p. 2034-41.
82. Marshall, R.P., A. Puddicombe, W.O. Cookson, and G.J. Laurent, *Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom*. Thorax, 2000. **55**(2): p. 143-6.
83. Williams, E.J. and J.P. Iredale, *Liver cirrhosis*. Postgrad Med J, 1998. **74**(870): p. 193-202.
84. Lee, U.E. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 195-206.
85. Schuppan, D. and N.H. Afdhal, *Liver cirrhosis*. Lancet, 2008. **371**(9615): p. 838-51.
86. Pinzani, M. and J. Macias-Barragan, *Update on the pathophysiology of liver fibrosis*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **4**(4): p. 459-72.
87. Schiff, E.R. and N. Ozden, *Hepatitis C and alcohol*. Alcohol Res Health, 2003. **27**(3): p. 232-9.
88. Wiegand, J. and T. Berg, *The Etiology, Diagnosis and Prevention of Liver Cirrhosis: Part 1 of a Series on Liver Cirrhosis*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(6): p. 85-91.
89. Malhi, H. and G.J. Gores, *Cellular and molecular mechanisms of liver injury*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1641-54.
90. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
91. Durand, F. and D. Valla, *Assessment of prognosis of cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(1): p. 110-22.
92. Chaiteerakij, R. and L.R. Roberts, *Telomerase mutation: a genetic risk factor for cirrhosis*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1430-2.
93. Rudolph, K.L., S. Chang, M. Millard, N. Schreiber-Agus, and R.A. DePinho, *Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery*. Science, 2000. **287**(5456): p. 1253-8.
94. Kodali, V.P., S.C. Gordon, A.L. Silverman, and D.G. McCray, *Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non-A, non-B, and non-C hepatitis*. Am J Gastroenterol, 1994. **89**(10): p. 1836-9.
95. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C*. Hepatology, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 62S-65S.
96. Poynard, T., V. Ratziu, F. Charlotte, Z. Goodman, J. McHutchison, and J. Albrecht, *Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2001. **34**(5): p. 730-9.
97. Aguilera, V., M. Berenguer, A. Rubin, F. San-Juan, J.M. Rayon, M. Prieto, and J. Mir, *Cirrhosis of mixed etiology (hepatitis C virus and alcohol): Posttransplantation outcome-Comparison with hepatitis C virus-related cirrhosis and alcoholic-related cirrhosis*. Liver Transpl, 2009. **15**(1): p. 79-87.
98. Bataller, R., Y.H. Paik, J.N. Lindquist, J.J. Lemasters, and D.A. Brenner, *Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 529-40.
99. Phukan, J.P., A. Sinha, and J.P. Deka, *Serum lipid profile in alcoholic cirrhosis: A study in a teaching hospital of north-eastern India*. Niger Med J, 2013. **54**(1): p. 5-9.
100. Stickel, F., S. Buch, K. Lau, H. Meyer zu Schwabedissen, T. Berg, M. Ridinger, M. Rietschel, C. Schafmayer, F. Braun, H. Hinrichsen, R. Gunther, A. Arlt, M. Seeger, S. Muller, H.K. Seitz, M. Soyka, M. Lerch, F. Lammert, C. Sarrazin, R. Kubitz, D. Haussinger, C. Hellerbrand, D. Broring, S. Schreiber, F. Kiefer, R. Spanagel, K. Mann, C. Datz, M. Krawczak, N. Wodarz, H. Volzke, and J. Hampe, *Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 86-95.

101. Cahill, A., C.C. Cunningham, M. Adachi, H. Ishii, S.M. Bailey, B. Fromenty, and A. Davies, *Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion*. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(6): p. 907-15.
102. Lieber, C.S., *The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(3-4): p. 511-29.
103. Kurose, I., H. Higuchi, S. Miura, H. Saito, N. Watanabe, R. Hokari, M. Hirokawa, M. Takaishi, S. Zeki, T. Nakamura, H. Ebinuma, S. Kato, and H. Ishii, *Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 368-78.
104. Adachi, M., H. Higuchi, S. Miura, T. Azuma, S. Inokuchi, H. Saito, S. Kato, and H. Ishii, *Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(3): p. G695-705.
105. Higuchi, H., M. Adachi, S. Miura, G.J. Gores, and H. Ishii, *The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes*. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 320-8.
106. Yin, M., M.D. Wheeler, H. Kono, B.U. Bradford, R.M. Gallucci, M.I. Luster, and R.G. Thurman, *Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice*. Gastroenterology, 1999. **117**(4): p. 942-52.
107. Miura, N., I. Horikawa, A. Nishimoto, H. Ohmura, H. Ito, S. Hirohashi, J.W. Shay, and M. Oshimura, *Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **93**(1): p. 56-62.
108. Aikata, H., H. Takaishi, Y. Kawakami, S. Takahashi, M. Kitamoto, T. Nakanishi, Y. Nakamura, F. Shimamoto, G. Kajiyama, and T. Ide, *Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(2): p. 578-82.
109. Kitada, T., S. Seki, N. Kawakita, T. Kuroki, and T. Monna, *Telomere shortening in chronic liver diseases*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(1): p. 33-9.
110. Schildkraut, J.M., E.L. Goode, M.A. Clyde, E.S. Iversen, P.G. Moorman, A. Berchuck, J.R. Marks, J. Lissowska, L. Brinton, B. Peplonska, J.M. Cunningham, R.A. Vierkant, D.N. Rider, G. Chenevix-Trench, P.M. Webb, J. Beesley, X. Chen, C. Phelan, R. Sutphen, T.A. Sellers, L. Pearce, A.H. Wu, D. Van Den Berg, D. Conti, C.K. Elund, R. Anderson, M.T. Goodman, G. Lurie, M.E. Carney, P.J. Thompson, S.A. Gayther, S.J. Ramus, I. Jacobs, S. Kruger Kjaer, E. Hogdall, J. Blaakaer, C. Hogdall, D.F. Easton, H. Song, P.D. Pharoah, A.S. Whittemore, V. McGuire, L. Quaye, H. Anton-Culver, A. Ziogas, K.L. Terry, D.W. Cramer, S.E. Hankinson, S.S. Tworoger, B. Calingaert, S. Chanock, M. Sherman, and M. Garcia-Closas, *Single nucleotide polymorphisms in the TP53 region and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2349-57.
111. Garcia-Closas, M., V. Kristensen, A. Langerod, Y. Qi, M. Yeager, L. Burdett, R. Welch, J. Lissowska, B. Peplonska, L. Brinton, D.S. Gerhard, I.T. Gram, C.M. Perou, A.L. Borresen-Dale, and S. Chanock, *Common genetic variation in TP53 and its flanking genes, WDR79 and ATP1B2, and susceptibility to breast cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2532-8.
112. Rotman, Y., C. Koh, J.M. Zmuda, D.E. Kleiner, and T.J. Liang, *The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2010. **52**(3): p. 894-903.
113. Romeo, S., J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, L.A. Pennacchio, E. Boerwinkle, J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1461-5.
114. Marcolongo, M., B. Young, F. Dal Pero, G. Fattovich, L. Peraro, M. Guido, G. Sebastiani, G. Palu, and A. Alberti, *A seven-gene signature (cirrhosis risk score) predicts liver fibrosis progression in patients with initially mild chronic hepatitis C*. Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1038-44.
115. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups*. Lancet, 1997. **349**(9055): p. 825-32.

- 
116. Missiha, S.B., M. Ostrowski, and E.J. Heathcote, *Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(6): p. 1699-714.
  117. Powell, E.E., C.J. Edwards-Smith, J.L. Hay, A.D. Clouston, D.H. Crawford, C. Shorthouse, D.M. Purdie, and J.R. Jonsson, *Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2000. **31**(4): p. 828-33.
  118. Huang, H., M.L. Shiffman, R.C. Cheung, T.J. Layden, S. Friedman, O.T. Abar, L. Yee, A.P. Chokkalingam, S.J. Schrodi, J. Chan, J.J. Catanese, D.U. Leong, D. Ross, X. Hu, A. Monto, L.B. McAllister, S. Broder, T. White, J.J. Sninsky, and T.L. Wright, *Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(6): p. 1679-87.
  119. Huang, H., M.L. Shiffman, S. Friedman, R. Venkatesh, N. Bzowej, O.T. Abar, C.M. Rowland, J.J. Catanese, D.U. Leong, J.J. Sninsky, T.J. Layden, T.L. Wright, T. White, and R.C. Cheung, *A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2007. **46**(2): p. 297-306.
  120. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(10): p. 745-50.
  121. Kim, W.R., J.B. Gross, Jr., J.J. Poterucha, G.R. Locke, 3rd, and E.R. Dickson, *Outcome of hospital care of liver disease associated with hepatitis C in the United States*. *Hepatology*, 2001. **33**(1): p. 201-6.
  122. Vulliamy, T.J. and I. Dokal, *Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex*. *Biochimie*, 2008. **90**(1): p. 122-30.
  123. Batista, L.F., M.F. Pech, F.L. Zhong, H.N. Nguyen, K.T. Xie, A.J. Zaug, S.M. Crary, J. Choi, V. Sebastiano, A. Cherry, N. Giri, M. Wernig, B.P. Alter, T.R. Cech, S.A. Savage, R.A. Reijo Pera, and S.E. Artandi, *Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2011. **474**(7351): p. 399-402.

## **7 Abkürzungsverzeichnis**

ALT	Alanin-Aminotransferase (auch: ALAT, GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
AST	Aspartat-Aminotransferase (auch: ASAT, GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase)
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAB Box	Cajal Body Box
DC	Dyskeratosis Congenita
DKC1	Dyskeratosis Congenita 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonucleotid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GAR1	Glycine and arginine rich domain 1
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
hTERC	Humane Telomerase RNA Component
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis; Idiopathische Lungenfibrose
kb	Kilobasen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger RNA
NASH	Nichtalkoholische Fettleberhepatitis (Non-Alcoholic Steatohepatitis)
NHP2	Non-histone protein 2
NOP10	Nucleolar protein 10
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
POT1	Protection of telomeres 1
RAP1	Repressor Activator Enzym 1
Rb	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure

---

RNP	Ribonukleoprotein
scaRNA	Small Cajal Body RNA
snoRNA	Small nucleolar RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism; Einzelnukleotidpolymorphismus
TBE	Trisborat-EDTA Puffer
TCAB1	Telomerase Cajal Body Protein1
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor; transformierender Wachstumsfaktor
TIN2	TRF1-interacting Nuclear Factor 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRF1	Terminal Restriction Fragment 1
TRF2	Terminal Restriction Fragment 2
UTR	Untranslated Region; untranslatierter Bereich
WRAP53	WD40-encoding RNA antisense to p53

## **8 Danksagung**

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer, Dr. Dr. Daniel Hartmann für die unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft. Ohne sein stetiges Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Dr. Michaela Thaler möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung und sachkundige Beratung danken.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter der AG Ceyhan. Jeder einzelne hat dazu beigetragen, dass die Stunden im Labor sehr kurzweilig waren. Ganz besonders danke ich Frau Ulrike Bourquain, die gute Fee des Labors, die für jeden ein offenes Ohr hat.

Meiner Familie möchte ich für ihre bedingungslose Unterstützung und tatkräftige Hilfe danken. Ihr Vertrauen und ihre Geduld haben mir die nötige Kraft und das Selbstvertrauen gegeben alle Herausforderungen zu meistern.