



Genetik  
(neu)  
entdecken?

**Swissmilk:** Symposium über die nichtalkoholische  
Fettlebererkrankung vom 14. Sept. 2015

## „Veranlagungen und Erkrankungsrisiken“

Prof. em. Dr. med. Hansjakob Müller  
Facharzt FMH für Medizinische Genetik  
Medizinische Genetik USB  
Universität Basel





## Was ist eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)?

American Association for the Study of Liver Disease; American College of Gastroenterology, American Gastroenterological Association (ASLD Practice Guidelines 2012)

- a. Evidenz von hepatischer Steatose (Histologie; Bildgebung)
- b. Keine Ursache von sekundärer hepatischer Fettakkumulation
  - Medikamente
  - Erbkrankheiten
  - Alkoholabusus
- c. Jedoch Assoziation mit metabolischen Risikofaktoren wie Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, Dyslipidämie, metabolisches Syndrom

ferner: polyzystisches Ovarsyndrom, Hypothyreoidismus, obstruktiver Schlafapnoe, Hypopituitarismus, Hypogonadismus, Bypass-Chirurgie

Zudem Einfluss des Alters, des Geschlechts, der ethnischen Herkunft!

*Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist eine komplexe Krankheit, bei der variable genetische Eigenschaften der Patienten mit verschiedenen Umwelteinflüssen interagieren und ihren Verlauf beeinflussen!*

## Aufbau des Referates

1. Monogene Erbkrankheiten
2. Multifaktoriell verursachte Krankheiten
  - GWAS = genomweite Assoziationsstudien
  - „Gentests“ bei komplexen Krankheiten
  - *PNPLA3*-Gen Polymorphismus
3. Interaktionen mit der Umwelt
4. Morbus Crohn und Interaktionen mit Mikrobioten
5. Akute Schwangerschaftsleber und fetale Mortalität
6. NAFLD und genetische Evolution des Menschen
7. Abschliessende Bemerkungen

## Ein Blick auf unser Erbgut (Genom)!

Es besteht aus:

- 23 Chromosomenpaaren (46,XY oder 46,XX)

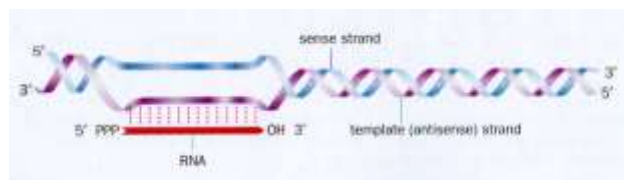


Sie enthalten gesamthaft:

- 2 x 3 Milliarden Basenpaaren

~ 1.5% für Exons funktioneller Gene (ca 20'000 bis 25'000)

Was ist ein Eiweiss-kodierendes Gen:



## Monogene Ursachen der Fettleber

(Störungen des Lipidmetabolismus)

Erbkrankheit	Gen	Erbgang
Familiäre Hypobetalipoproteinämie	<i>apoB100</i>	AR
Familiäre kombinierte Hyperlipidämie	<i>USF1</i>	AD
Glykogen-Speicherkrankheiten	<i>PHKA2, PHKB</i>	AR
Abetalipoproteinämie	<i>MTTP</i>	AR
Lipodystrophie	<i>AGPAT2, BSCL2</i>	AR

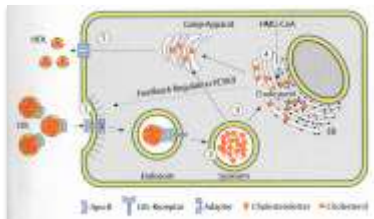
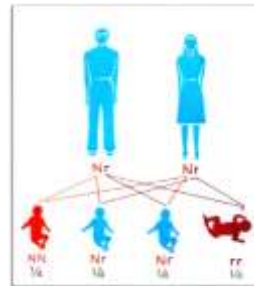
Bei der Differenzialdiagnostik einer chronischen Lebererkrankung sollten das Vorliegen häufiger monogener Erbkrankheiten wie Hämochromatose, alpha1-Antitrypsinmangel oder Morbus Wilson ausgeschlossen werden!

*Weiterführende Informationen :*  
*OMIM = Datenbank über menschliche Gene, deren nachgewiesene Mutationen und ihre klinischen Auswirkungen*

## Stoffwechselkrankheit Niemann-Pick Typ C (NPC)



Autosomal-rezessiver Erbgang



Symptome:

- Hepatosplenomegalie
- Ophthalmoplegie
- progressive Ataxie
- Dystonie
- Demenz

Ursache: ③ Defekt des intrazellulären Cholesterol-Transportes

## Was wissen wir heute über monogen vererbte Krankheiten? (Genotyp-Phänotyp-Beziehungen)

### OMIM Entry Statistics

Number of Entries in OMIM (Updated September 12th, 2015) :

Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
* Gene description	14,231	699	48	35	15,013
+ Gene and phenotype, combined	82	2	0	2	86
# Phenotype description, molecular basis known	4,213	297	4	29	4,543
% Phenotype description or locus, molecular basis unknown	1,511	129	5	0	1,645
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,706	112	2	0	1,820
Totals	21,743	1,239	59	66	23,107



26.06.2000

## Ein zweiter Blick auf unser Erbgut!



Es besteht aus:

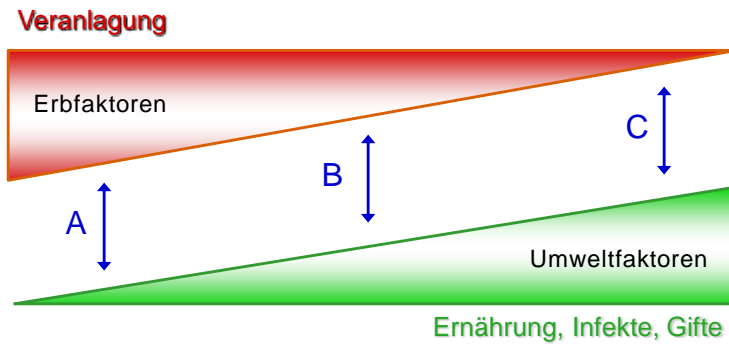
- 2 x 3 Milliarden Basenpaaren davon :

~ 1.5% Exons funktioneller Gene (Exom)  
(ca. 20'000 bis 25'000)

- Rest:
- Pseudogene
  - RNAonly-Gene (rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, miRNA und siRNA, antisense-RNA)
  - regulatorische Elemente (Enhancer, Silencer)
  - Startorte der DNA-Replikation
  - Sequenzen mit strukturellen Aufgaben (Telomer)
  - repetitive Sequenzen mit und ohne Funktion

*Wie wissen noch recht wenig über  
den Aufbau und die Funktionen unsere Erbgutes!*

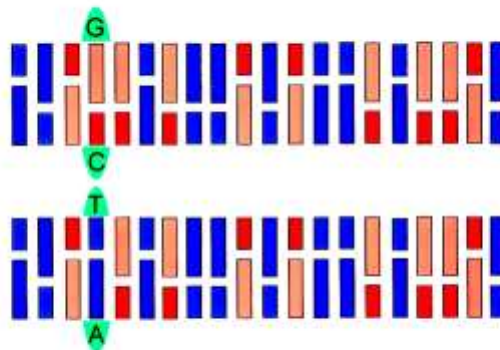
## Multifaktoriell verursachte (komplexe) Krankheiten



Mit der nichtalkoholischen **Fettleber** assoziierte multifaktoriell verursachte (komplexe) Krankheitsformen:

- Adipositas
- Diabetes mellitus Typ 2
- koronare Herzkrankheiten
- Autoimmunkrankheiten

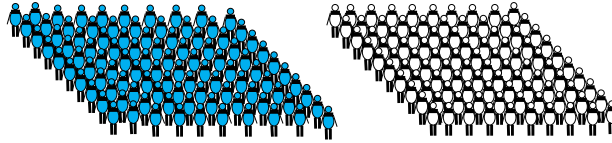
## Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)



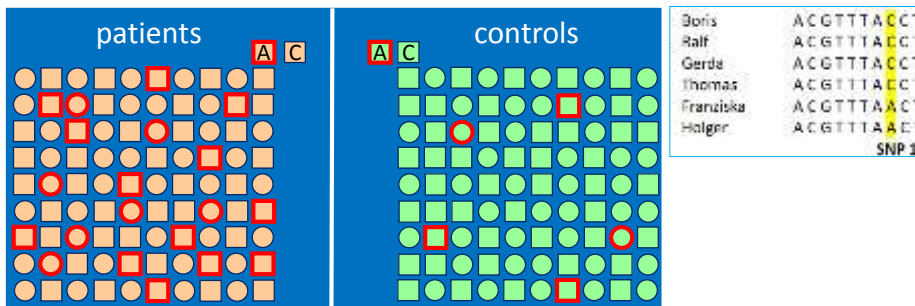
- Basenunterschied:
- stabil vererbt
  - sehr häufig (1 SNP/1000 Basenpaare)  
Schätzung: 4.2 Millionen SNP in Genom
  - einfach zu detektieren (häufig diallelisch)

## GWAS – genome-wide association analysis

1. Genotype SNPs across the genome (300.000 – 1 Mio.)  
in patients and controls



2. Compare frequency of each SNP between patients and controls



*Zur Erfassung von genetischen Risikofaktoren!*

## Probleme von Assoziationsstudien

- widersprüchliche Resultate
- „publication bias“: Negative Ergebnisse werden allgemein selten veröffentlicht.
- multiple Studien auf unterschiedlicher Basis (Krankheitsdefinitionen, Grösse der Kollektive, Kontrollpopulation)
- ethnische Unterschiede
- Erwartungshaltung

*Studien mit sehr vielen TeilnehmerInnen, die ihre genomischen und klinischen Daten freigeben, sind zur Schliessung der heutigen Wissenslücke notwendig!*




## Zuordnung von „Kandidat-Genen“ bei der Entstehung einer Fettleber

Sie beeinflussen:

- den Lipid-Metabolismus (inkl. Lipoproteine)
- die Insulin-Resistenz
- den Glukose-Metabolismus
- den oxydativen Stress
- Entzündungen und Immunantworten
- die Apoptose
- und vieles andere mehr

*Neue therapeutische Möglichkeiten dürften sich aus dem dank GWAS gesammelten Wissen ableiten lassen!*

## Genetische Modifikatoren der progressiven Fettlebererkrankung

Normal	
	e.g.: <b>PNPLA3</b> , <b>MTTP</b> , <b>PEMT</b> , <b>ADIPOR2</b> , <b>ApoC3</b> , <b>PXR</b> , <b>TCF7L2</b> ; <b>ApoE</b> , <b>MRP2</b> , <b>NCAN</b>
Steatose	
	e.g.: <b>HFE</b> , <b>SOD2</b> , <b>PNPLA3</b> , <b>GCIC</b> , <b>TLR4</b> , <b>CD14</b> , <b>TNF</b> , <b>sTNFr-2</b> , <b>FDFT1</b> , <b>IL6</b>
Steatohepatitis	
	e.g.: <b>ADIPOQ</b> , <b>AGT</b> , <b>ATGR1</b> , <b>KLF6</b> , <b>SOD2</b> , <b>PNPLA3</b> , <b>TGFb1</b> , <b>COI13A1</b> , <b>TMS6SF2</b>
Zirrhose	<i>Fettschrift: Verifiziert in mehreren Studien</i>

Lit.: Anstee QM et al. *Biochimica et Biophysica Acta* (2011) 1812; 1557 – 1566

Siehe auch Wood KL, Miller MH, Dillon JF. *BMJ Open Gastro* 2015;2:e000019.  
doi:10.1136/bjmgast-2014-000019 (nächste Folie)



Pathway	Gene symbol <sup>a</sup>	Name <sup>b</sup>	Cytogenetic location <sup>a</sup>	Studies (n)
Lipid metabolism	<i>PNPLA3</i>	Patatin-like phospholipase domain-containing 3	22q13.31	11
	<i>LPIN1</i>	Lipin 1	2p26.1	1
	<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$	22q13.31	2
	<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$	3p25.2	5
	<i>PPARGC1A</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ , coactivator 1 $\alpha$	4p15.2	1
Lipoprotein transport and metabolism	<i>APOC3</i>	Apolipoprotein C-III	11q23.3	2
	<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	19q13.32	4
	<i>OLR1 (LOX-1)</i>	Oxidised low-density lipoprotein receptor 1	12p13.2	1
	<i>PEMT</i>	Phosphatidylethanolamine <i>N</i> -methyltransferase	17p11.2	2
	<i>MTPP</i>	Microsomal triglyceride transfer protein	4q23	5
Cholesterol biosynthesis	<i>SREBF1</i>	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1	17p11.2	1
	<i>SREBF2</i>	Sterol regulatory element-binding transcription factor 2	22q13.2	1
Oxidative stress	<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	6q25.3	2
	<i>UCP3</i>	Uncoupling protein 3	11q13.4	1
Inflammatory response	<i>GCFC</i>	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	6p12.1	1
	<i>TNF</i>	Tumour necrosis factor	6p21.33	7
	<i>IFNL3 (IL28B)</i>	Interferon $\lambda$ 3	19q13.2	1
	<i>IL6</i>	Interleukin 6	7p15.3	1
	<i>IL1</i>	Interleukin 1	2q13	1
	<i>CD14</i>	CD14 molecule	5q31.3	1
	<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4	9q33.1	1
	<i>MIF</i>	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	22q11.23	1
Metabolic hormones	<i>ADRB3</i>	Adrenoceptor $\beta$ 3	8p11.23	1
	<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	3q27.3	3
	<i>LEPR</i>	Leptin receptor	1p31.3	2
Metabolism—transcription factors	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	17q21.2	1
	<i>CLOCK</i>	Clock circadian regulator	4q12	1
	<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	1p36.22	2
Hepatic iron accumulation	<i>KLF6</i>	Kruppel-like factor 6	10p15.1	1
	<i>CHUK</i>	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	10q24.31	1
	<i>HFE</i>	Haemochromatosis	6p22.2	6
	<i>TMPRSS6</i>	Transmembrane protease, serine 6	22q12.3	1

## Genetische Variation des *PNPLA3*-Gens

<Romeo S et al. *Nature Genetics* 40, 1461-1465 (2008)>

Das *PNPLA3*-Gen (Adiponutrin) kodiert ein Eiweiss, das zur Patatin-ähnlichen Phospholipase-Familie gehört.

Eine häufige Variante (rs738409) des *PNPLA3*-Gens ist mit dem Fettgehalt der Leber, aber auch mit deren Fibrose/Zirrhose und dem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms assoziiert; sie macht diese empfindlicher gegenüber Umweltbelastungen.

Diese Variante führt zu einer Substitution von Cytosin durch Guanin, die das Codon 148 verändert: Methionin statt Isoleuzine wird dort eingebaut (p.I148M).

Die Häufigkeit des rs738409-Allels stimmt mit dem Auftreten der NAFLD in den drei untersuchten ethnischen Gruppen der Dallas Heart Study überein: Spanier (0.49), europäische Amerikaner (0.23), afrikanische Amerikaner (0.17).

Im Gegensatz zur hereditären Hämochromatose, die durch Mutationen (85%: p.282Cys>Tyr) des *HFE*-Gens zurückzuführen ist, gilt die *PNPLA3*-assoziierte Steatohepatitis (= PASH) noch nicht als monogene Erbkrankheit.

<Krawczyk M. et al. *J Hepatol* 62, 980-981(2015)>

## Weitere bedeutungsvolle genetische Varianten für die NAFLD-Pathophysiologie

### *TM6SF2* rs58542926 C>G:

- reduziert die Sekretion von VLDL, was zur intrahepatischen Retention von Triglyceriden führt.
- beeinflusst die Progression zur hepatischen Fibrose.

Kozlitina J. et al.: *Nature Genetics* 46, 352-356 (2014)

Holmen OL et al.: *Nature Genetics* 46, 454-351 (2014)

Mahdessian et al.: *PNAS USA* 111, 8913-8918 (2014)

### Zu erhöhtem Fettgehalt der Leber führen zudem:

- *NCAN*, rs2228603(T): verändert den Lipidmetabolismus
- *GCKR*, rs780094: aktiviert die hepatische Glukose-Aufnahme
- *LYPLAL1*, rs12137855: gestörter Triglycerid-Metabolismus
- etc.

Dongiovanni P. et al: *BioMed Research International* 2015, Article ID 460190

Gordon A. et al. *Hum Hered.* 75: 34-43 (2013)

## Fettleibigkeit

Gründe, warum ein genetisches Screening für „Obesity“-Gene wenig Sinn macht und sogar kontraproduktiv sein kann:



- Veranlagung: 100-200 Gene
- geringe Aussagekraft
- kaum Einfluss auf therapeutische Massnahmen (Diät, körperliche Aktivitäten)
- negativer Einfluss auf Anstrengungen zur Reduktion des Körpergewichts
- Anstieg der Gesundheitskosten

## Gene-Lifestyle Interaction and Type 2 Diabetes: The EPIC InterAct Case-Cohort Study

Claudia Langenberg<sup>1,2\*</sup>, Stephen J. Sharp<sup>1,2</sup>, Paul W. Franks<sup>2,3,4</sup>, Robert A. Scott<sup>1</sup>, Panos Deloukas<sup>4</sup>, Nita G. Forouhi<sup>1</sup>, Philippe Froguel<sup>2</sup>, Leif C. Group<sup>5,7</sup>, Torben Hansen<sup>6,7</sup>, Luigi Pala<sup>1</sup>, Oluf Pedersen<sup>8,10,11</sup>, Matthias B. Schulze<sup>1,2</sup>, Maria-Jose Tormo<sup>1,2,4,12</sup>, Eleanor Wheeler<sup>4</sup>, Claudia Agnoli<sup>13</sup>, Lamaitz Arriola<sup>14,17,18</sup>, .....  
 Chapelon<sup>21,22</sup>, Eric Kay Tee Khaw<sup>23</sup>, J Peter M. Nilsson<sup>24</sup>, Olov Rolandsson<sup>25</sup>, Annett M. W. Schouw<sup>26</sup>, Inês Bui

### Abstract

**Background:** Understanding of the genetic basis of type 2 diabetes (T2D) has progressed rapidly, but the interactions between common genetic variants and lifestyle risk factors have not been systematically investigated in studies with adequate statistical power. Therefore, we aimed to quantify the combined effects of genetic and lifestyle factors on risk of T2D in order to inform strategies for prevention.

**Methods and Findings:** The InterAct study includes 12,403 incident T2D cases and a representative sub-cohort of 16,154 individuals from a cohort of 340,234 European participants with 3.99 million person-years of follow-up. We studied the combined effects of an additive genetic T2D risk score and modifiable and non-modifiable risk factors using Prentice-weighted Cox regression and random effects meta-analysis methods. The effect of the genetic score was significantly greater in younger individuals ( $p$  for interaction =  $1.20 \times 10^{-4}$ ). Relative genetic risk (per standard deviation [4.4 risk alleles]) was also larger in participants who were leaner, both in terms of body mass index ( $p$  for interaction =  $1.50 \times 10^{-9}$ ) and waist circumference ( $p$  for interaction =  $7.49 \times 10^{-9}$ ). Examination of absolute risks by strata showed the importance of obesity for T2D risk. The 10-y cumulative incidence of T2D rose from 0.25% to 0.89% across extreme quartiles of the genetic score in normal weight individuals, compared to 4.22% to 7.99% in obese individuals. We detected no significant interactions between the genetic score and sex, diabetes family history, physical activity, or dietary habits assessed by a Mediterranean diet score.

**Conclusions:** The relative effect of a T2D genetic risk score is greater in younger and leaner participants. However, this subgroup is at low absolute risk and would not be a logical target for preventive interventions. The high absolute risk associated with obesity at any level of genetic risk highlights the importance of universal rather than targeted approaches to lifestyle intervention.

Please see later in the article for the Editors' Summary.

69% der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wiesen bei der Ultraschall-Untersuchung eine NAFLD auf. (Leite NC et al.: *Liver Int* 2009; 29: 113 -119)

## Aussagekraft molekulargenetischer Test

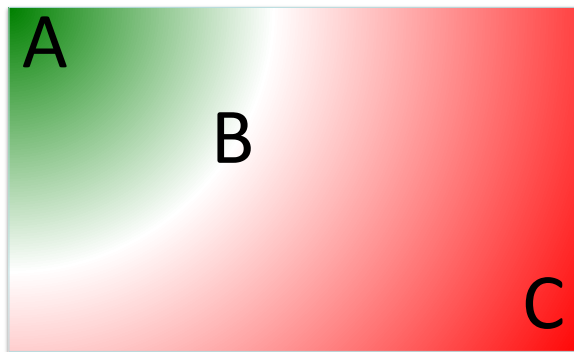
gut ← → schlecht

Erblichkeit

gross



gering



Verursachung der Krankheit/Eigenschaft

einfach



komplex

A = Genmutation mit grosser Durchschlagskraft (monogene Erbkrankheit)

B = Suszeptilitätsgen mit mässiger Durchschlagskraft

C = Die meisten SNPs aus GWAS

## Epigenetische Modifikationen des Erbgutes

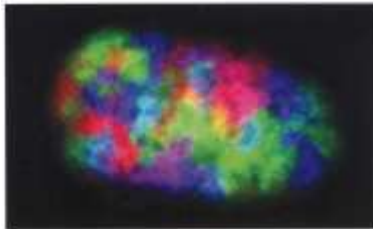
Methylierung zahlreicher Cytosinbasen speziell im Promotorbereich (CpG-Inseln)

Modifikation von Histonproteinen (Verpackung der DNA)

RNA-Interferenz auf verschiedenen Ebenen:  
prä- und postranskriptionell, translationell

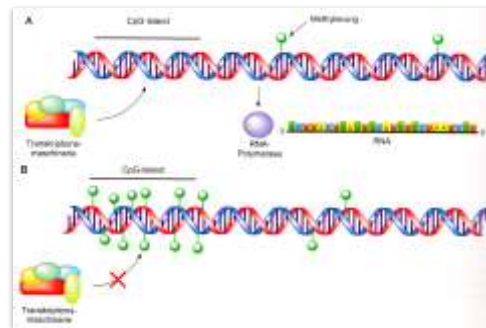
Position der Chromosomen im Zellkern

### Architektur und Organisation des Erbgutes im Zellkern



## Epigenetik

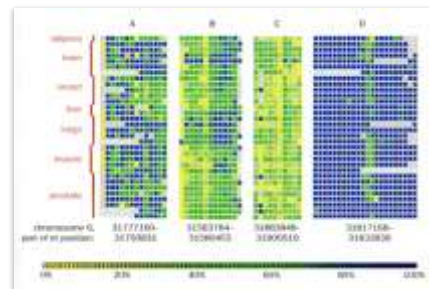
### Methylierung



Die Muster der CpG-Methylierung aufgezeigt am Histokompatibilitätskomplex sind:

- Personen-spezifisch
- Gewebe-spezifisch
- Locus-spezifisch

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2014)  
*Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2571-2587



## Epigenetik und NAFLD

**Table 1.** Epigenetic mechanism for non-alcoholic fatty liver disease.

Mechanism	Subject	Study Result	References
DNA Methylation	Mouse	Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis.	Pogribny <i>et al.</i> [50]
	Human	Hepatic methylation and transcriptional activity of the <i>MT-ND6</i> are associated with the histological severity of NAFLD.	Pirola <i>et al.</i> [51]
	Mouse	Puffs from dams fed a high fat diet display characteristics of NAFLD phenotype and associated changes in gene expression and DNA methylation.	Dudley <i>et al.</i> [52]
	Mouse	Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiologic events in liver injury.	Tryndyak <i>et al.</i> [53]
	Human	Epigenetic regulation of insulin resistance in NAFLD: Impact of liver methylation of the PPAR $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ promoter.	Sookoian <i>et al.</i> [54]
	Human	Altered methylation of genes that regulate processes such as steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis indicate the role of DNA methylation in progression of NAFLD.	Murphy <i>et al.</i> [55]

Lit.: Lee JH *et al.* *Nutrients* (2014) 6: 3303-3325

*Die Erforschung der epigenetischen Mechanismen, die in die Pathogenese der NAFLD involviert sind, steckt noch in den Kinderschuhen!*

## Morbus Crohn

Für Veranlagung sprechen:

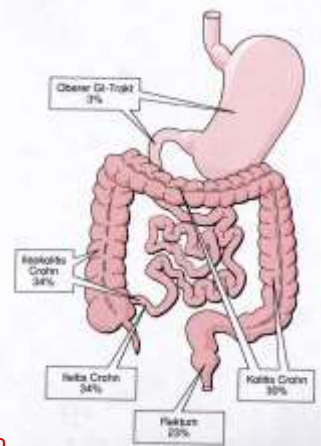
- familiär gehäuftes Auftreten
- herkunftsspezifisches Verteilungsmuster
- HLA-B27 positive Patienten zusätzlich: ankylosierende Spondylitis

Für Umwelteinflüsse sprechen:

- Verbreitung in westlichen Industrienationen
- Verdacht auf infektiösen Hintergrund

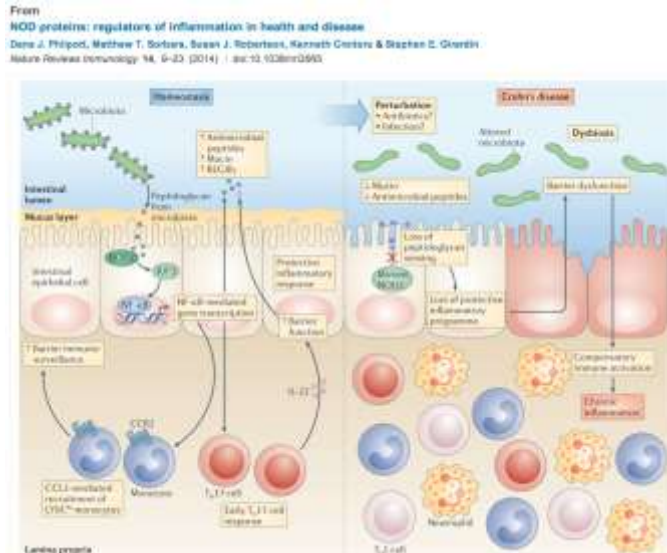
Häufige Komplikationen:

- Gallensteine
- Leberverfettung
- durch Medikamente induzierte Leberkrankheiten



*Varianten spezifischer Gene (ATG16LI, IL23R, IRGM und NOD2) erhöhen das Risiko, am Morbus Crohn zu erkranken. Diese führen dazu, dass die Zellen des Magendarmtrakts nicht normal auf Bakterien reagieren, was zu Entzündung und Verdauungsproblemen führt.*

## Mikrobiom und Morbus Crohn: zur Rolle von *NOD2*



Kollektives Genom aller Mikroorganismen (Mikrobiota) im Darm wiegt etwa 2 kg

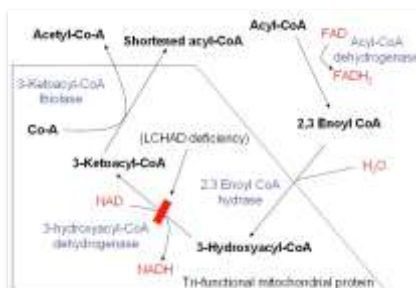
## Schwangerschaft: akute Schwangerschaftsfettleber

**Ursache:** - Defekt im mitochondrialen Energiestoffwechsel der Hepatozyten wegen 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD)-Mangel  
 - Frauen oft heterozygot für E474Q Mutation des *LCHAD*-Gens

**Klinik:** - Manifestation in der 30. – 38. SSW oder nach der Geburt durch Übelkeit, Erbrechen, rechtsseitiger Abdominalschmerz, Appetitlosigkeit  
 später: Ikterus, Aszites, Hypertonie, periphere Oedeme

**Prognose:**

- bei schnellstmöglicher Entbindung: gut
- bei fulminantem Leberversagen: Lebertransplantation
- fetale Mortalität hoch (früher: 85%; heute: 9 – 23%)



Mitochondriale beta-Oxidation der mittel- und langkettigen Fettsäuren und Auswirkungen des LCHAD-Mangels



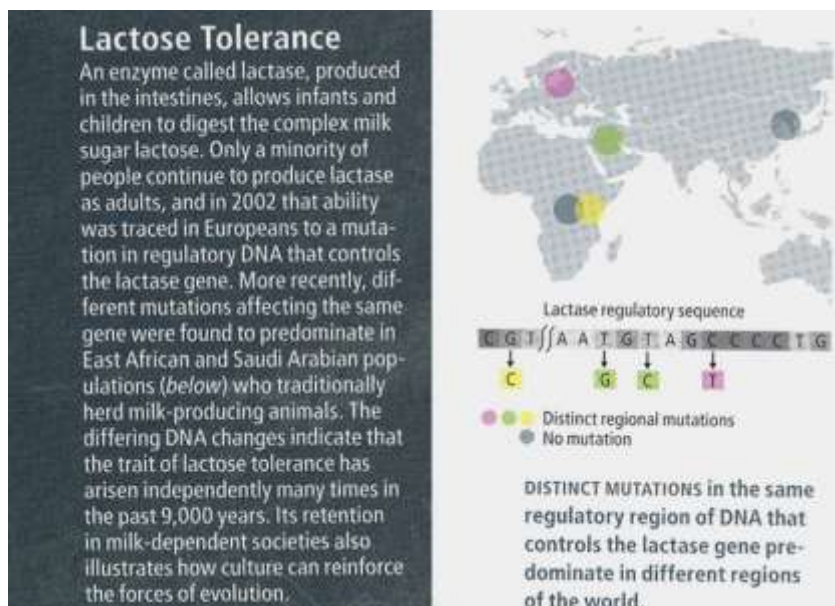
## Die Evolution des Menschen geht weiter!

Gregory Cochran and Henry Harpending:  
The 10'000 Year Explosion:  
How Civilisation Accelerated Human Evolution.  
Basic Books (2009)

Umfang der Studie: 270 Personen aus 4 ethnischen Gruppen:  
China, Japan, Yoruba und Nord-Europa

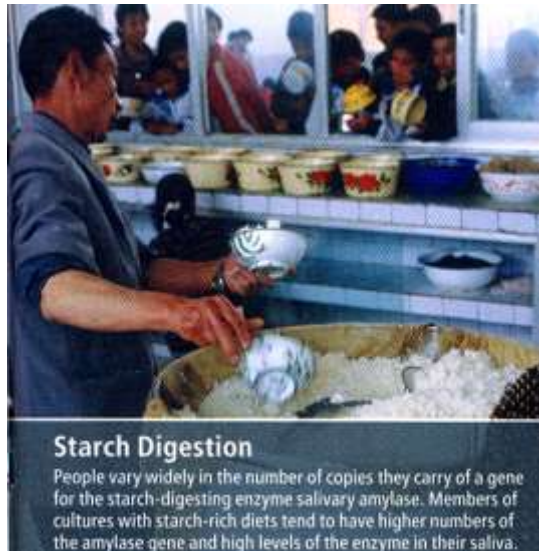
Ergebnis: Mindestens 7% der menschlichen Gene haben  
während der vergangenen 5'000 Jahren evolutionäre  
Veränderungen erfahren.

Die meisten dieser Veränderungen sind Anpassungen an die  
nähere Umwelt.



Mutationen des *MCM6*-Gens

## “Gene-copy number variants” des *AMY1*-Gens



Spaltung der Stärke in Malzzucker

## Die Medizin wird immer datenbasierter!

Die genetische Labordiagnostik trägt zu dieser Entwicklung bei!  
 Die 4 Ps sind die Folge!!

Die Medizin wird:

- prädikativ
- präventiv
- personalisiert
- partizipativ

Wie steht es um das Arzt-Patient-Beziehungsnetz?

*Der Arzt kann im Umgang mit seinem Patienten Dinge erfassen, die nicht leicht artikulierbar und quantifizierbar sowie mit einem genetischen Labortest nicht erfassbar sind?*



## Translation genetischer Laborbefunde

Interpretation

Kommunikation

Genetische  
Labordaten  
(Mutationen/Varianten)



Genetische  
Informationen  
(klinische Relevanz)



Individuelle  
ärztliche Hilfe

unter Berücksichtigung von:

- Indikation
- Aussagekraft / Reichweite
- Eigenschaften der Erbkrankheit

Medizinisch-genetische Fakten plus:

- Psychosoziale Implikationen
- Ethische Aspekte
- Rechtliche Gegebenheiten