

# **Diplomarbeit**

## **V444A-Polymorphismus der Gallensäuren-Exportpumpe ("bile salt export pump"; BSEP) bei pädiatrischen PatientInnen**

eingereicht von

**Eva-Maria Hochstrasser**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr.<sup>in</sup> med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der/dem

**Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde**

**Institut für Humangenetik**

unter Anleitung von

**Mag.<sup>a</sup> rer. nat. Dr.<sup>in</sup> scient. med. Lisa Ofner-Ziegenfuß**

**OA. Dr. med. univ. Jörg Jahnel**

**Ass.Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Mag.<sup>a</sup> Dr.<sup>in</sup> rer. nat. Ellen Heitzer**

Graz, 08.10.2015

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, 08.10.2015*

*Eva-Maria Hochstrasser eh*

## **Danksagung**

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um mich sehr herzlich bei einigen Personen zu bedanken, die ihre Zeit investiert haben, um mich auf unterschiedliche Weise bei der Erstellung dieser Diplomarbeit zu unterstützen.

Allen voran ein großes Danke an meinen Betreuer Dr. Jahnel, der mir fachlich zur Seite stand, mich umfangreich unterstützt hat und es bei regelmäßigen Treffen sehr gut verstand, meine Motivation hochzuhalten und das Vollenden der Arbeit voranzutreiben.

Tatkräftige Unterstützung erhielt ich auch von meinen Betreuerinnen an der Humangenetik Dr. Ofner und Dr. Heitzer, für die ich mich herzlichst bedanken möchte.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur beim Schreiben der Diplomarbeit, sondern während des gesamten Studiums in jeglicher Art zur Seite standen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Schwester, die mich auf so vielfältige Weise unterstützte und mir immer den Rücken stärkte, sowie auch bei meinem kleinen Bruder, meiner gesamten Familie und Freunden und Freundinnen.

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Gallensäuren (GS) sind wesentlich für die Aufrechterhaltung des Galleflusses, die Cholesterinausscheidung sowie für die Fettverdauung. Eine wichtige Rolle für den Transport von GS aus den Hepatozyten in die Gallenkanalikululi spielt der Transporter BSEP (Bile salt export pump). Das Auftreten des klinisch relevanten Polymorphismus V444A im *ABCB11*-Gen hat Studien zufolge eine Rolle bei der Entwicklung einer Schwangerschaftscholestase sowie bei Medikamenten-induzierten Cholestasen. Ziel dieser Studie war, herauszufinden, ob V444A auch in Kombination mit weiteren Erkrankungen wie Ebstein-Barr-Virus (EBV), Akute Lymphatische Leukämie (ALL), Cholezystolithiasis oder Hepatopathie unklarer Genese zu einer Cholestase prädisponiert.

**Methoden:** Kindern zwischen 0 und 18 Jahren, die im Rahmen einer Grunderkrankung eine Hyperbilirubinämie entwickelten oder erhöhte Leberwerte im Labor zeigten, wurde Blut abgenommen und an das Institut für Humangenetik zur Genotypisierung des V444A-Polymorphismus im *ABCB11*-Gen übermittelt. Die daraus ermittelten Allelfrequenzen wurden mit Kontrollpopulationen verglichen, um zu überprüfen, ob der Polymorphismus in der Studienpopulation gehäuft auftritt. Zusätzlich wurde die Höhe des Bilirubinspiegels in Korrelation zum Gen-Status gestellt, um einen möglichen Zusammenhang zu erkennen.

**Ergebnisse:** Das homo- bzw. heterozygote Vorliegen des V444A-Polymorphismus konnte bei allen ALL-PatientInnen und bei acht von neun PatientInnen mit einer EBV-Infektion nachgewiesen werden. Bei Cholezystolithiasis und Hepatopathie unklarer Genese konnte keine Korrelation zum V444A-Status hergestellt werden. In allen Gruppen aber war ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Bilirubinspiegels und dem V444A-Genotyp zu erkennen: die Mittelwerte homozygoter Kinder waren immer höher als jene der heterozygoten Kinder, teilweise bis um ein Vierfaches so hoch.

**Diskussion:** Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen stark erhöhten Bilirubinwerten und dem V444A-Polymorphismus ( $p < 0,05$ ). Eine Korrelation zwischen V444A und einer Hyperbilirubinämie bei EBV bzw. ALL ist nicht auszuschließen, ein Nachweis der Signifikanz wird Ziel weiterer Studien sein. Das Ermitteln des V444A-Status ist sinnvoll bei PatientInnen, die im Rahmen einer Grunderkrankung eine transiente, unklare Hyperbilirubinämie entwickeln, um unnötige Abklärungsuntersuchungen zu vermeiden.

## Abstract

**Background:** Bile acids are essential for the maintenance of bile flow, cholesterol excretion as well as for fat digestion. The bile salt export pump (BSEP) plays an important role in the transport of bile acids from the hepatocytes into the canaliculi. The occurrence of BSEP-polymorphism V444A is significantly correlated to the development of intrahepatic cholestasis of pregnancy as well as drug-induced cholestasis. The aim of this study was to observe whether the V444A polymorphism predisposes to hyperbilirubinemia in combination with other diseases such as Epstein-Barr virus (EBV), acute lymphoblastic leukemia (ALL), cholelithiasis or hepatopathy of unknown origin.

**Methods:** Blood samples were taken from children between 0 and 18 years, who developed hyperbilirubinemia in the context of an underlying disease or showed elevated liver enzymes. Their V444A-status was analysed at the Institute of Human Genetics to find out whether V444A was more frequent in the study population. Additionally the level of bilirubin was correlated to the genotype in order to identify a possible association.

**Results:** The homo- or heterozygous presence of the V444A-polymorphism was detected in all ALL patients and in eight of nine patients with EBV infection. No correlation could be established to cholelithiasis and liver disease of unknown origin. But in all groups a correlation between the level of bilirubin and V444A was evident: the mean values of homozygous children were always higher than those of heterozygous children, even up to four-fold.

**Conclusion:** There is a significant correlation between strongly elevated bilirubin and the V444A polymorphism ( $p < 0.05$ ). A correlation between V444A and hyperbilirubinemia in EBV or ALL cannot be excluded. Showing evidence of the significance will be the goal of further studies. The determination of the V444A status is useful in patients who develop a transient, unclear hyperbilirubinemia in the context of an underlying disease, to avoid unnecessary follow-up examinations.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Zusammenfassung .....	IV
Abstract .....	VI
Inhaltsverzeichnis .....	VII
Glossar und Abkürzungen .....	IX
Abbildungsverzeichnis .....	XII
Tabellenverzeichnis .....	XIV
1. Einleitung .....	1
1.1. Hintergrund .....	1
1.2. Funktioneller Aufbau der Leber .....	2
1.3. Leber und Galle .....	3
1.4. Gallensäuren .....	4
1.4.1. Funktion .....	4
1.4.2. Synthese .....	4
1.4.3. Enterohepatischer Kreislauf .....	6
1.4.4. Wichtige Transporter im enterohepatischen Kreislauf .....	7
1.4.5. Regulierung des Gallensäuren-Metabolismus .....	9
1.5. Bile Salt Export Pump .....	10
1.5.1. V444A-Polymorphismus .....	12
1.5.2. Intrahepatische Schwangerschaftscholestase und Kontrazeptiva-induzierte Cholestase .....	
1.5.3. Medikamenten-induzierte Cholestase .....	15
1.5.4. Weitere Auswirkungen von V444A .....	15
1.6. Cholestase .....	15
1.7. Bilirubin und Ikterus .....	16
1.8. Erkrankungen mit Lebermitbeteiligung .....	17
1.8.1. Infekte .....	17
1.8.2. Akute Lymphatische Leukämie .....	19

1.8.3.	Cholezystolithiasis .....	19
1.8.4.	Sonstige Erkrankungen.....	20
2.	Methoden.....	22
2.1.	PatientInnenrekrutierung.....	22
2.1.1.	Einschlusskriterien.....	22
2.1.2.	Ausschlusskriterien.....	23
2.2.	Datenerhebung .....	23
2.2.1.	Hauptzielgröße.....	23
2.2.2.	Nebenzielgrößen .....	24
2.3.	Auswertung und Statistik.....	24
2.4.	Ethik.....	25
2.5.	Erhebung des genetischen Status .....	25
3.	Ergebnisse.....	26
3.1.	PatientInnencharakterisierung .....	26
3.2.	Auswertung nach Krankheiten .....	28
3.2.1.	Akute Lymphatische Leukämie.....	28
3.2.2.	Epstein-Barr-Virus-Infektion.....	30
3.2.3.	Cholezystolithiasis .....	32
3.2.4.	Hepatopathie unklarer Genese .....	34
3.2.5.	Andere Erkrankungen.....	37
3.3.	Symptomorientierte Auswertung .....	40
3.3.1.	Hyperbilirubinämie.....	40
3.3.2.	Korrelation mit weiteren Laborwerten .....	49
4.	Diskussion .....	51
	Literaturverzeichnis .....	56
	Anhang: Projektplan .....	63

## Glossar und Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ABCB11	ABC-Transporter B11
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ASBT	Apical Sodium Dependent Bile Salt Transporter
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bili	Bilirubin
BRIC	Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis
BSEP	Bile Salt Export Pump
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Cholsäure
CC	Homozygot CC
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CHE	Cholinesterase
CIC	Contraceptive-Induced Cholestasis
CRP	C-reaktives Protein
DCA	Deoxycholsäure
DH	Drug-induced hepatocellular injury

DIC	Drug-Induced Cholestasis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein Barr Virus
F	weiblich
FIC1	Familiäres intrahepatisches Cholestase 1 - Protein
FXR	Farnesoid X Rezeptor
G	Guanin
ges.	gesamt
GGT	Gamma Glutamyltransferase
ICP	Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy
IM	Infektiöse Mononukleose
Kap.	Kapitel
LCA	Lithocholsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
M	männlich
MDR	Multidrug-resistance protein
MRP2	Multidrug Resistance-Associated Protein Typ 2
NTCP	Na-Taurocholate Co-Transport Polypeptide
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptides
OST $\alpha/\beta$	Organic Solute Transporter alpha and beta
PFIC	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TC	Heterozygot TC
TT	Homozygot TT

UDP	Uridin Diphosphat
u.a.	unter anderem
V	Valin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Leber.....	3
Abbildung 2: Chemische Struktur der wichtigsten Gallensäuren.....	5
Abbildung 3: Enterohepatische Zirkulation der Gallensäuren.....	6
Abbildung 4: Hepatobiliäre Transportsysteme.....	8
Abbildung 5: Gallensäuretransporter in Leber, Cholangiozyten und Enterozyten und Transkriptionsfaktoren für die Regulierung.....	9
Abbildung 6: Ausschnitt aus dem genetischen Code des BSEP-Proteins.....	12
Abbildung 7: Bilirubin-Metabolismus in Hepatozyten und Störungen.....	17
Abbildung 8: Häufige Symptome in der Studienpopulation.....	27
Abbildung 9: Verteilung der Ausprägung von V444A in der gesamten Studienpopulation.....	28
Abbildung 10: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Akuter Lymphatischer Leukämie.....	29
Abbildung 11: Höhe des Gesamtbilirubins bei Akuter Lymphatischer Leukämie nach Genetik.....	30
Abbildung 12: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit EBV- Infektion.....	31
Abbildung 13: Höhe des Gesamtbilirubins bei EBV-Infektion nach Genetik.....	32
Abbildung 14: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Cholezystolithiasis.....	33

Abbildung 15: Höhe des Gesamtbilirubins bei Cholezystolithiasis nach Genetik .....	34
Abbildung 16: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Hepatopathie unklarer Genese.....	36
Abbildung 17: Höhe des Gesamtbilirubins bei Hepatopathie unklarer Genese nach Genetik.....	36
Abbildung 18: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit sonstigen Erkrankungen.....	38
Abbildung 19: Höhe des Gesamtbilirubins bei sonstigen Erkrankungen nach Genetik.....	39
Abbildung 20: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie.....	43
Abbildung 21: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie .....	45
Abbildung 22: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit mäßig erhöhter Hyperbilirubinämie .....	46
Abbildung 23: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit normalem Bilirubinspiegel .....	48
Abbildung 24: Höhe des Gesamtbilirubins in der gesamten Studienpopulation nach Genetik.....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wildtyp und Ausprägungen des V444A-Polymorphismus.....	13
Tabelle 2: Häufigkeit von V444A .....	13
Tabelle 3: Häufigkeit von V444A in der recherchierten Literatur .....	14
Tabelle 4: PatientInnencharakterisierung .....	26
Tabelle 5: Laborparameter von PatientInnen mit Akuter Lymphatischer Leukämie...28	
Tabelle 6: p-Werte für ALL .....	29
Tabelle 7: Laborparameter von PatientInnen mit EBV-Infektion.....	30
Tabelle 8: p-Werte für EBV.....	31
Tabelle 9: Laborparameter von PatientInnen mit Cholezystolithiasis .....	33
Tabelle 10: p-Werte für Cholezystolithiasis .....	34
Tabelle 11: Laborparameter von PatientInnen mit Hepatopathie unklarer Genese ...35	
Tabelle 12: p-Werte für Hepatopathie unklarer Genese .....	36
Tabelle 13: Laborparameter von PatientInnen mit sonstigen Erkrankungen .....	37
Tabelle 14: p-Werte für sonstige Erkrankungen .....	38
Tabelle 15: Übersicht über die Studienpopulation gereiht nach der Höhe ihrer Bilirubinspiegel .....	41
Tabelle 16: Übersicht über PatientInnen mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie	42
Tabelle 17: p-Werte für Gruppe 1 .....	43

Tabelle 18: Übersicht über PatientInnen mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie .....	44
Tabelle 19: p-Werte für Gruppe 2.....	45
Tabelle 20: Übersicht über PatientInnen mit mäßig erhöhter Hyperbilirubinämie .....	46
Tabelle 21: p-Werte für Gruppe 3.....	47
Tabelle 22: Übersicht über PatientInnen mit Bilirubinwerten innerhalb des Normbereiches .....	47
Tabelle 23: p-Werte für Gruppe 4.....	48

# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergrund

Im klinischen Alltag auf der Kinderklinik Graz wurden wiederholt Fälle von Kindern beobachtet, die z.B. im Rahmen einer Epstein-Barr-Virus-Infektion (EBV) oder einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) einen Ikterus ausprägten. Bei einer EBV-Infektion ist eine Lebermitbeteiligung zwar häufig, in der Regel kommt es jedoch nicht zu einer Gelbsucht. Nach Abklingen der Infektion bzw. des ALL-Schubes gingen die Symptome und auch die Bilirubinwerte wieder in den Normbereich zurück. Dies führte zu der Annahme, dass bei diesen Kindern zusätzlich zur Erkrankung ein weiterer Faktor vorhanden war, der die PatientInnen dazu prädisponierte, im Zuge ihrer Erkrankung eine Hyperbilirubinämie zu entwickeln.

Einem in der Literatur beschriebenen Polymorphismus im *BSEP*-Gen, dem V444A-Polymorphismus (dbSNP rs2287622), wird ein Zusammenhang mit der Entwicklung von Cholestasen im Rahmen bestimmter Ereignisse zugeschrieben: Träger der Genvariante neigen signifikant häufiger dazu, eine Schwangerschaftscholestase zu entwickeln und auch eine Korrelation mit Cholestasen nach Einnahme von Kontrazeptiva wird diskutiert. Als Auslöser wird der höhere Östrogenspiegel angenommen. Auch bei PatientInnen, die Medikamenten-induziert eine Cholestase entwickelten, konnte der V444A-Polymorphismus signifikant häufiger festgestellt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob der V444A-Genpolymorphismus auch bei den cholestatischen Fällen, die auf der Kinderklinik beobachtet werden konnten, häufiger auftritt. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob eine Korrelation zwischen der Höhe des Bilirubinspiegels und der homo- bzw. heterozygoten Ausprägung des V444A-Polymorphismus besteht.

## **1.2. Funktioneller Aufbau der Leber**

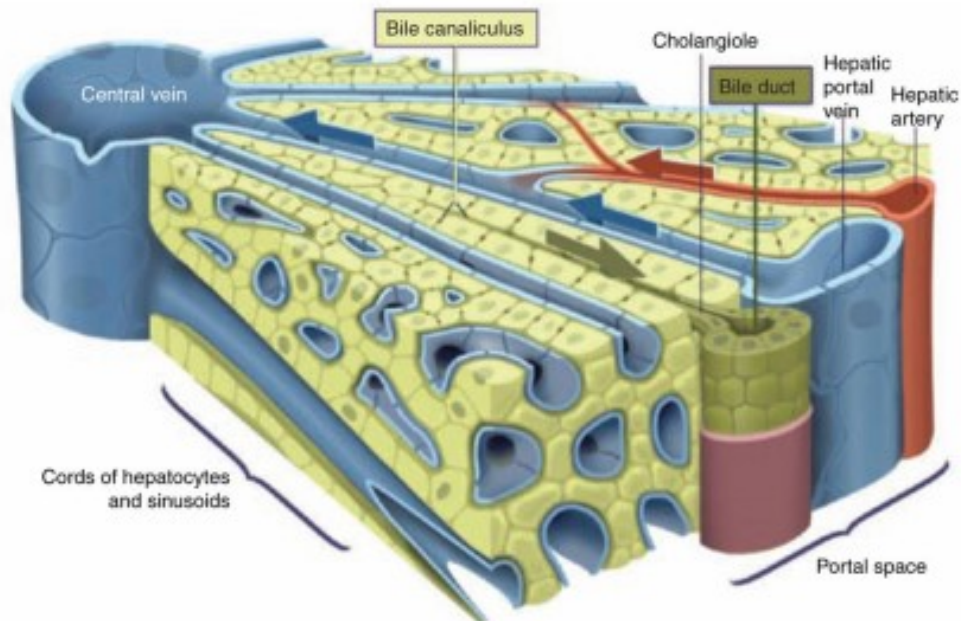
Den häufigsten Zelltyp der Leber stellen die Hepatozyten dar. Diese Leberepithelzellen sind funktionell und morphologisch polar aufgebaut mit einer basolateralen (dem Leber-Sinus zugewandten) Membran und einer apikalen (dem Gallenkanalikus zugewandten) Membran.

Der Gallenkanalikus besitzt kein eigenes Epithel, sondern wird von benachbarten Hepatozyten geformt, die ein gemeinsames Lumen bilden, welches durch „tight junctions“ abgedichtet ist. Die Kanalikuli münden in die Gallengänge, welche bereits ein eigenes Epithel aus Cholangiozyten besitzen, und diese wiederum münden in den *Ductus coledochus*.

Der die Hepatozyten umgebende Leber-Sinus wird von Blut aus der Pfortader und der Leberarterie gespeist und besitzt ein fenestriertes Epithel ohne Basalmembran, wodurch die Passage für sämtliche Blutbestandteile sehr leicht erfolgen kann. Der Blutfluss erfolgt in Richtung der Zentralvenen, über die das Blut in die untere Hohlvene abfließt (siehe Abb. 1).

Funktionell erfolgt an der basolateralen Membran die Aufnahme und an der apikalen Membran die Abgabe von Substanzen, wie z.B. der Gallensäuren (GS). Dafür sind in den jeweiligen Membranen spezielle Transportproteine vorhanden, um eine Beförderung gegen den Konzentrationsgradienten zu ermöglichen [1–4].

### (A) The Liver lobe



**Abbildung 1: Aufbau der Leber.** Das aus der Leberarterie und der Pfortader kommende Blut strömt in die Lebersinusoiden, von wo aus der Stoffaustausch mit den Hepatozyten geschieht, und fließt dann in die Portalvene ab. Galle wird von den Hepatozyten in die Gallenkanalikululi sezerniert und von dort weiter in die Gallengänge abgeleitet. Aus Treyer et al. [4].

### 1.3. Leber und Galle

Die Leber ist das zentrale Organ für den Stoffwechsel. Ihre Aufgaben reichen von der Synthese einer Vielzahl von Substanzen über Speicherung (Fett, Zucker) bis hin zum Abbau und zur Entgiftung. Als größte Drüse des menschlichen Körpers produziert die Leber die Galle. Diese setzt sich zusammen aus GS, Phospholipiden, Cholesterin sowie zahlreichen Metaboliten von körpereigenen und körperfremden Substanzen (u.a. Steroide, Abbauprodukte des Hämoglobins, Pharmaka), für die sie als Ausscheidungsmedium dient.

Pro Tag werden in der Leber etwa 900 ml Primärgalle produziert. Diese wird während ihres Transportes in den intrahepatischen Gallengängen modifiziert, wodurch es zur Sekundärgalle oder „Lebergalle“ kommt. Davon gelangt die Hälfte direkt ins Duodenum, die andere Hälfte wird in der Gallenblase zwischengespeichert und gleichzeitig durch den Entzug von Wasser bis zu 10-

fach konzentriert. Bei Nahrungsaufnahme kontrahiert die Gallenblase und die „Blasengalle“ wird in den Darm entleert [1].

## **1.4. Gallensäuren**

### **1.4.1. Funktion**

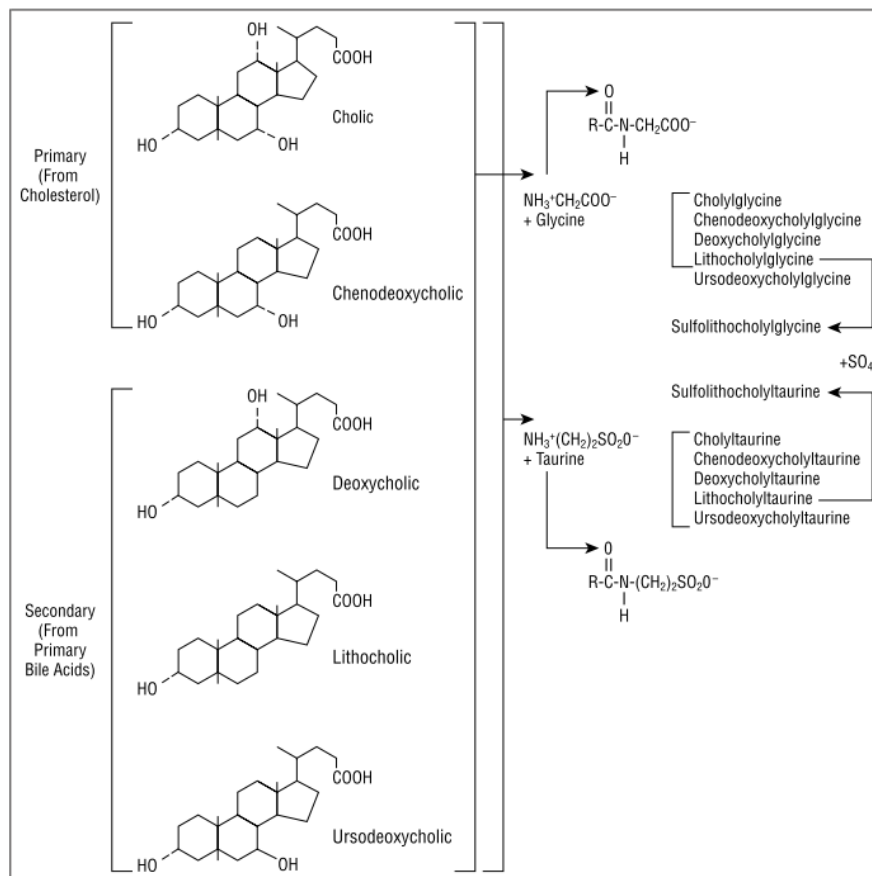
Die Funktionen der GS sind vielfältig. Erstens dienen sie der Ausscheidung von Cholesterin aus dem Körper. Dies geschieht einerseits dadurch, dass Cholesterin den Grundbaustein für die GS darstellt, andererseits dienen sie durch Bildung von gemischten Mizellen zusammen mit Phospholipiden als Transportmedium für Cholesterin und weitere Substanzen. Damit können diese schlecht wasserlöslichen Verbindungen mit der Galle in den Darm transportiert und dort über den Stuhl ausgeschieden werden. Eine zweite sehr wesentliche Aufgabe der GS ist die Aufnahme von Nahrungsfetten und fettlöslichen Vitaminen (A, D, E, K) wiederum mithilfe von Mizellen als Transportmedium aus dem Darm. Drittens sind die GS wesentlich für die Aufrechterhaltung des Galleflusses. Sie werden aktiv gegen einen Gradienten in die Gallenkanalikuli sezerniert, woraufhin Wasser und Elektrolyte osmotisch nachgezogen werden [5,6].

### **1.4.2. Synthese**

Den Grundbaustein für die GS stellt das Cholesterin dar. Über mehrere durch Enzyme vermittelte Prozesse werden daraus in der Leber die GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) hergestellt. Diese nennt man auch die **primären GS**. Danach werden sie mit den Aminosäuren Glycin (75 %) und Taurin (25 %) [7] konjugiert. Das macht sie wasserlöslicher und damit schlechter membranpermeabel und ermöglicht auf diese Weise hohe Konzentrationen an GS in den Kanalikuli. Ihre Bezeichnung lautet dann Glyko- bzw. Tauro-CA und Glyko- bzw. Tauro-CDCA. Durch diese Schritte ändern sich auch die chemischen Eigenschaften: Im Gegensatz zu dem hydrophoben Membranbaustein Cholesterin sind die neu synthetisierten GS wasserlöslich und amphiphil mit einem lipophilen

und einem hydrophilen Teil und können aufgrund dieser Eigenschaften als Emulgator für andere Substanzen dienen.

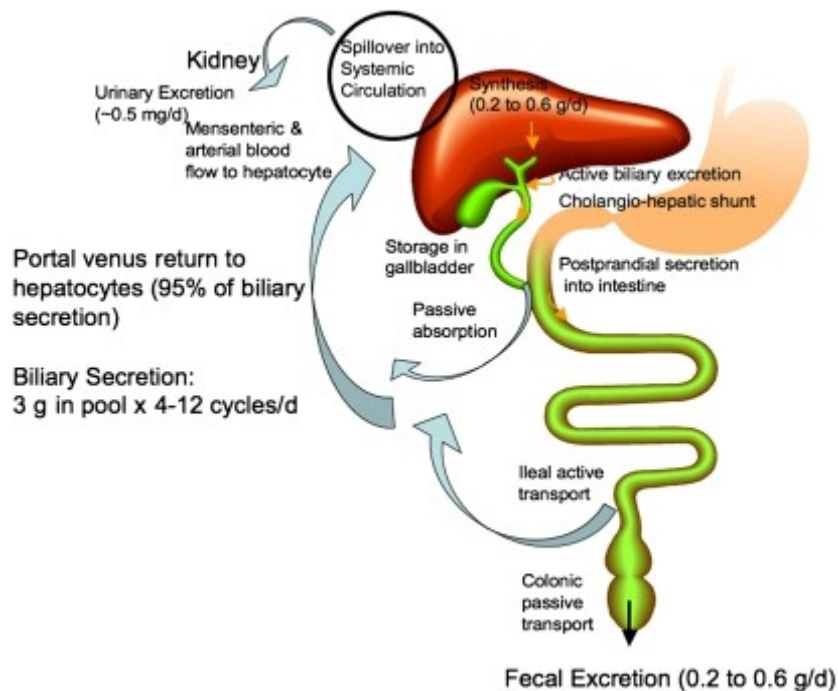
Im Darmlumen werden die primären GS durch Bakterien modifiziert. Die meisten werden wieder von Glycin und Taurin dekonjugiert. Über Dehydrolysierung werden die sogenannten **sekundären GS** gebildet. Dabei entsteht aus CA Deoxycholsäure (DCA) und aus CDCA Lithocholsäure (LCA) (siehe Abb.2). Den Großteil des GS-Pools im menschlichen Körper machen CA und CDCA aus, gefolgt von DCA. LCA weist eine sehr hohe Zytotoxizität auf und besitzt eine sehr schlechte Absorptionsrate im Darm, sie wird zum größten Teil über den Stuhl ausgeschieden [5].



**Abbildung 2: Chemische Struktur der wichtigsten Gallensäuren.** Die primären GS werden in der Leber synthetisiert und konjugiert. Im Darmlumen entstehen aus diesen mithilfe von Bakterien sekundäre GS. Aus Hofmann [5].

### 1.4.3. Enterohepatischer Kreislauf

Pro Tag werden vom menschlichen Körper etwa 12 - 40 g an GS [5,8] in das Darmlumen sezerniert, jedoch beläuft sich die tägliche *de-novo*-Syntheserate nur auf etwa 0,2 - 0,6 g/d [5,9]. Das ist dadurch zu erklären, dass die GS über den enterohepatischen Kreislauf durch Rückresorption recycelt werden. Dabei werden die von der Leber über das Gallengangssystem in das Darmlumen sezernierten Gallensäuren im terminalen Ileum wieder absorbiert. Über das Pfortaderblut gelangen sie schließlich vorwiegend Albumin-gebunden wieder in die Leber, wo sie mit einer sehr hohen First-Pass-Aufnahme zwischen, je nach GS, 50 bis 90 % [5] wieder in die Hepatozyten aufgenommen werden. Dieser Kreislauf wiederholt sich täglich etwa 4 – 12-mal [9]. Pro Tag werden 0,2 - 0,6 g [9] über den Stuhl ausgeschieden und durch die Synthese neuer GS in der Leber ersetzt, sodass der GS-Pool im menschlichen Körper mit etwa 2 – 3 g [5] konstant bleibt (siehe Abb. 3) [5,7,9].



**Abbildung 3: Enterohepatische Zirkulation der Gallensäuren.** GS werden in der Leber synthetisiert und in der Galle zwischengespeichert. Nach Nahrungsaufnahme werden sie in den Dünndarm ausgeschüttet. Ein Großteil davon wird wieder absorbiert und gelangt über das Portalblut wieder zur Leber zurück. Aus Chiang [9].

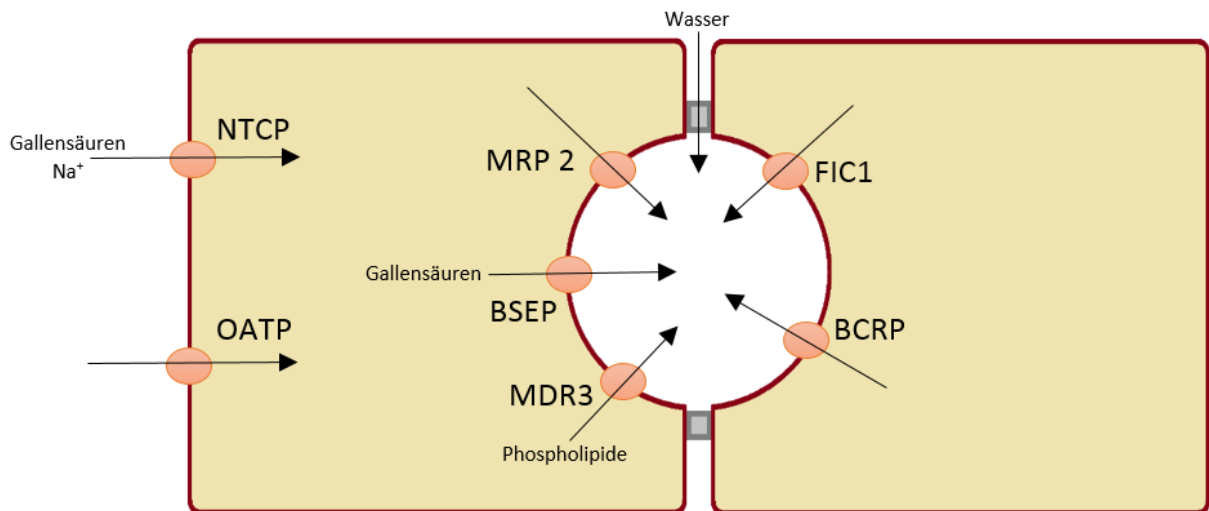
#### 1.4.4. Wichtige Transporter im enterohepatischen Kreislauf

Der Transport der GS durch die Membranen erfolgt über spezielle Transportproteine, die sowohl in den Hepatozyten als auch in den Enterozyten des terminalen Ileums zu finden sind.

##### Hepatozelluläre Aufnahme und Sekretion:

Basolaterale (sinusoidale) Membran: Die Aufnahme der reabsorbierten GS aus dem Portalblut in die Hepatozyten erfolgt zum größten Teil über den Natrium-abhängigen Transporter **NTCP** (Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide; sodium-dependent hepatocyte bile salt uptake system), der ausschließlich in der basolateralen Membran der Leber vorkommt, sowie über Natrium-unabhängige Transporter aus der Familie der **OATPs** (organic anion transporting polypeptides) [7,10].

Apikale (kanalikuläre) Hepatozytenmembran: Sowohl die reabsorbierten, als auch die in den Hepatozyten neu synthetisierten GS werden zum Großteil über die Bile Salt Export Pump (**BSEP**) aus den Hepatozyten in das kanalikuläre Lumen sezerniert. Die GS-Exportpumpe stellt im enterohepatischen Kreislauf den „rate-limiting step“ dar (Für eine genauere Beschreibung von BSEP siehe Kap. 1.5). **MRP2** (multidrug resistance-associated protein 2) ist für den Transport von glukuronierten und sulfatierten GS zuständig, daneben ist sie über die Sekretion von reduziertem Glutathion von Bedeutung für den GS-unabhängigen Transport. **BCRP** (breast cancer resistance protein) stellt einen weiteren Transporter für sulfatierte GS dar. **MDR3** (Multidrug-resistance-protein 3, auch bekannt als Phospholipidflippase) ist zuständig für den Transport von Phospholipiden aus den Hepatozyten in die Gallenkanalikuli. Phospholipide spielen eine wichtige Rolle in der Gallenzusammensetzung, da sie GS durch die Bildung gemischter Mizellen binden und damit die freien zytotoxischen GS reduzieren. Ein weiteres Transportprotein in der kanalikulären Membran ist **FIC1** (Familiäres intrahepatische Cholestase 1-Protein) (siehe Abb.4) [7,8].

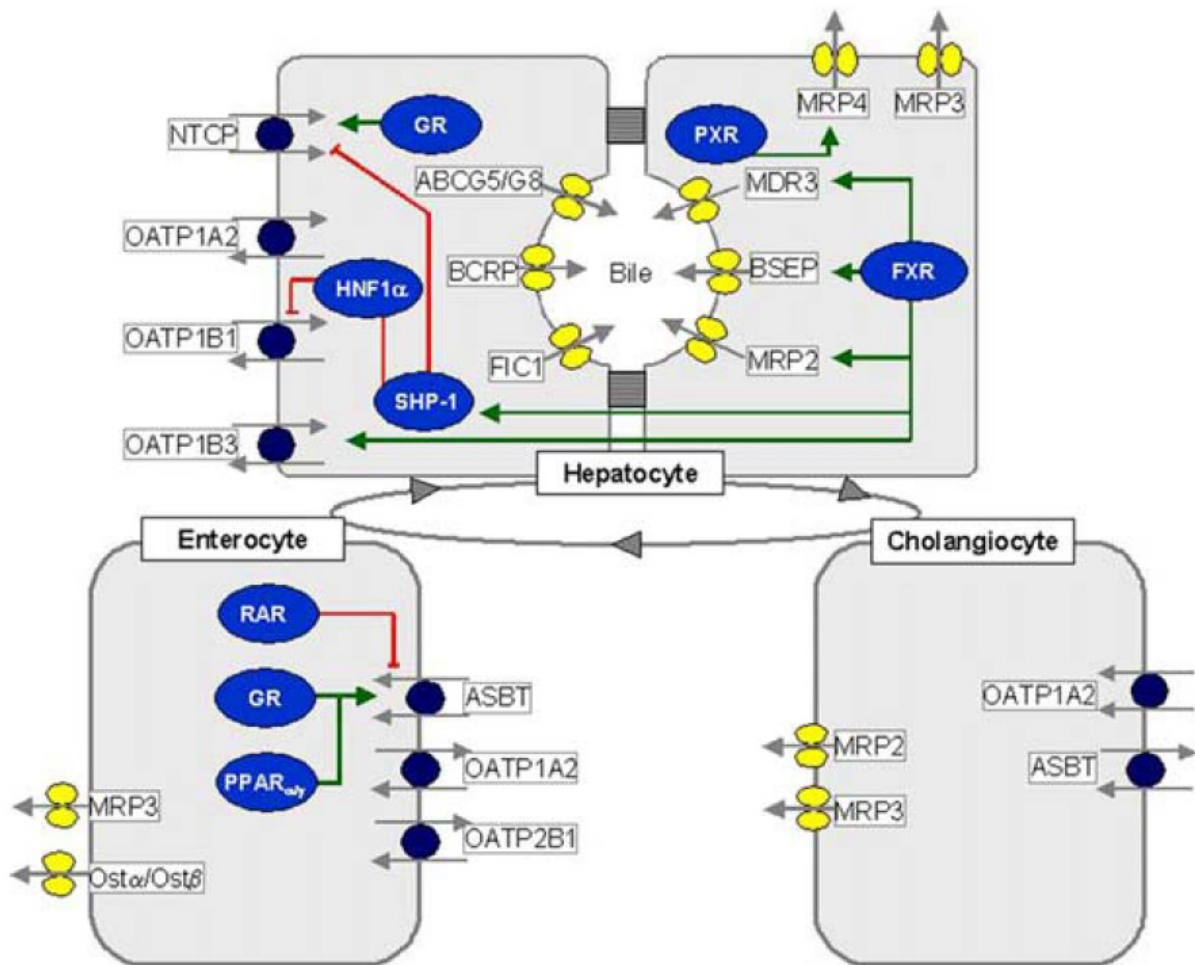


**Abbildung 4: Hepatobiliäre Transportsysteme.** Zwei Hepatozyten bilden gemeinsam, durch tight junctions (grau) verbunden, einen Gallekanalikulus. Sowohl in der sinusoidalen wie auch in der kanalikulären Membran befinden sich Transportsysteme für den Transport von GS, Phospholipiden, Bilirubin, Fremdstoffen u.a.

### Intestinale Absorption:

Apikale Membran: Auch wenn ein geringer Teil an unkonjugierten GS passiv im Jejunum absorbiert wird, erfolgt die wesentliche Aufnahme der GS, sowohl der primären als auch der sekundären, aus dem Darmlumen im terminalen Ileum aktiv über den **ASBT** (apical sodium dependent bile salt transporter). Dieser Transporter ist auch in Cholangiozyten und der Niere zu finden [5,7,10].

Basolaterale Membran: Nach einem proteingebundenen intrazellulären Transport durch die Enterozyten werden die GS über die seit kurzem bekannten Transporter **OST $\alpha$**  und **OST $\beta$**  (organic solute transporter alpha und beta) an der basolateralen Membran in das Portalblut abgegeben, mit dem sie, vor allem an Albumin gebunden, wieder in die Leber gelangen (siehe Abb. 5) [7].



**Abbildung 5: Gallensäuretransporter in Leber, Cholangiozyten und Enterozyten und Transkriptionsfaktoren für die Regulation.** Eine Vielzahl von Transportern ist an der Aufrechterhaltung des Gallenflusses beteiligt und unterliegt genauen Regulationen. Aus Pauli-Magnus et al.[8].

### 1.4.5. Regulation des Gallensäuren-Metabolismus

Eine zentrale Rolle in der langfristigen, transkriptionellen Regulation spielt der nukleäre Rezeptor FXR (Farnesoid X Receptor), der in der Leber exprimiert wird. Wird dieser aktiviert, kann er an DNA im Zellkern binden und dort die Transkription von Genen beeinflussen. GS regulieren sich indirekt selbst über positive und negative Feedbackmechanismen, indem sie Liganden für FXR sind. Hohe Konzentrationen an GS im Hepatozyten führen über die Aktivierung des Rezeptors und eine weitere Signalkaskade zu einer Hemmung der De-novo-Synthese der GS. Außerdem wird über FXR auch die Menge an BSEP-Transportern und MDR3

in der kanalikulären Membran reguliert. Dies fördert bei hohen GS-Konzentrationen einen raschen Abtransport in das kanalikuläre Gangsystem. Umgekehrt wird NTCP durch FXR gehemmt, um den Hepatozyten während einer Cholestase vor einer weiteren GS-Aufnahme zu schützen (siehe Abb. 5). ASBT und damit die GS-Aufnahme aus dem Darm wird ebenfalls durch FXR gehemmt. Kurzfristig existiert eine posttranskriptionelle Regulation, die schnell auf GS-Schwankungen, z.B. postprandial, reagieren kann: Die meisten kanalikulären Transporter befinden sich unter normalen Bedingungen intrazellulär und werden bei Bedarf in die kanalikuläre Membran eingebaut, um dort während hoher GS-Konzentrationen eine höhere Transporterdichte zu erreichen [8,9,11,12].

### **1.5. Bile Salt Export Pump**

Die GS-Exportpumpe (BSEP) wurde vor etwa 20 Jahren zum ersten Mal beschrieben. Der Transporter gehört zur Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette), welche die Energie für den Transport ihrer Substrate aus ATP (Adenosintriphosphat) beziehen. Das für die Pumpe codierende *ABCB11*-Gen befindet sich am q-Arm des Chromosoms 2 und ist 1321 Aminosäuren lang [10,13,14].

Energie in Form von ATP ist nötig, da die Gallensekretion gegen einen sehr hohen Gradienten zwischen Leberzellinnerem und der Galle erfolgen muss, da im kanalikulären Lumen die Konzentration bis zu 1000-fach höher ist. [11] BSEP kommt ausschließlich in der Leber vor. Der Transport über die kanalikuläre Membran ist der „rate-limiting step“ des enterohepatischen Kreislaufes der GS [10,15].

Da GS stark zytotoxisch sind, ist ein hochaffines Exportsystem wesentlich, um die intrazelluläre Konzentration niedrig zu halten. Von BSEP transportiert werden bevorzugt konjugierte GS, für unkonjugierte besitzt der Transporter eine schlechte Affinität [10,16].

Die Expression von BSEP wird von FXR reguliert, und zwar über das Substrat, für dessen Transport er zuständig ist: hohe GS-Konzentrationen in den Hepatozyten führen über die Aktivierung von FXR zu einer vermehrten Bildung von BSEP-RNA. Dadurch können die GS aus der Zelle transportiert werden und erreichen wieder normale intrazelluläre Konzentrationen [10,14].

Es gibt auch eine Reihe von erblichen Formen der Lebererkrankungen mit Cholestasen, wobei verschiedene Gendefekte in mehreren Genen als Auslöser beschrieben sind. Mutationen im *ABCB11*-Gen sind beispielsweise verantwortlich für zwei ähnliche Erkrankungen der Leber mit unterschiedlichem Schweregrad, die beide durch Symptome wie Ikterus, Pruritus, Transaminasenanstieg und Hepatomegalie in verschieden starker Ausprägung gekennzeichnet sind. Die schwerwiegendere Form stellt die **Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase 2** (PFIC 2) dar, die mit einem Fehlen des BSEP-Proteins einhergeht. Sie wird oft bereits im ersten Lebensjahr symptomatisch und führt nicht selten schon in jungen Jahren zu einer Zirrhose und einer terminalen Leberschädigung. Häufig ist eine Lebertransplantation erforderlich. Bei der leichteren Form handelt es sich um die **BRIC 2** (benign recurrent intrahepatic cholestasis 2), welche sich mit passageren Cholestasen präsentiert. Diese rufen aber keine Leberschädigung hervor und werden von symptomfreien Intervallen abgelöst, in denen auch die Laborwerte wieder in den Normbereich zurückkehren. Die beiden Krankheitsbilder sind nicht strikt voneinander zu trennen, sondern können auch ineinander übergehen.

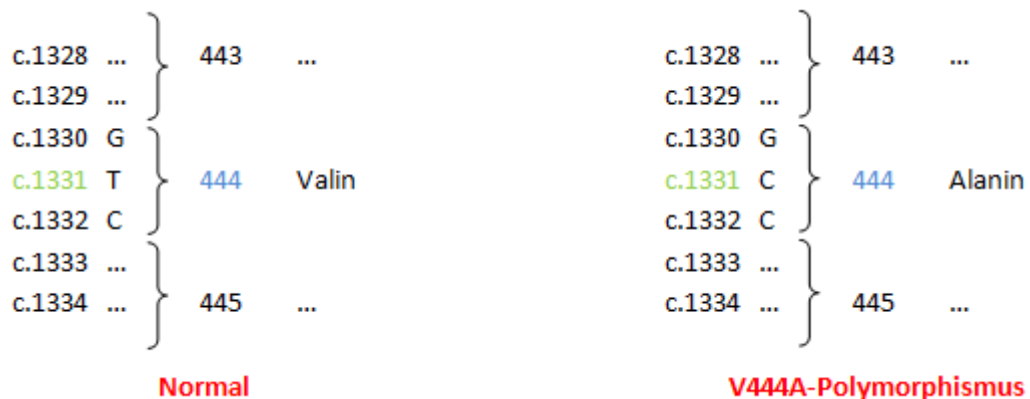
Des Weiteren spielt eine BSEP-Defizienz eine Rolle bei der medikamentös-toxischen Cholestase (DIC, drug-induced cholestasis), sowie auch bei der Intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP) [13–15,17,18].

Auch eine autoimmune Form der BSEP-Defizienz wird in der Literatur beschrieben. Dabei bildet der Körper Antikörper gegen die GS-Exportpumpe. Dadurch kann der GS-Transport nicht mehr aufrechterhalten werden und durch Stauung der zytotoxischen Gallensalze kommt es zu einer Leberzellschädigung wie bei der PFIC 2. Jedoch kann die Autoimmun-BSEP-Defizienz nicht durch eine

Transplantation geheilt werden, da BSEP nach der Operation erneut durch Antikörper angegriffen wird und die gleichen Symptome wie vorher wiederkehren [19,20].

### 1.5.1. V444A-Polymorphismus

Beim V444A-Polymorphismus (dbSNP: rs2287622) handelt es sich um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) im *ABCB11*-Gen, das heißt der Veränderung einer einzelnen Nukleinbase. Durch einen Einzelnukleotidaustausch an der Position 1331 im Exon 13 von Thymin zu Cytosin (c.1331T>C) kommt es zu einem Aminosäureaustausch. Je nachdem, ob das durch den SNP hervorgerufene neue Basentriplett für die gleiche oder für eine andere Aminosäure codiert, spricht man von einem synonymen (stummen) bzw. von einem nicht-synonymen SNP. Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen nicht-synonymen Polymorphismus: anstatt des für Valin codierenden Basentriplets GTC findet man nun das Triplett GCC, das für die Aminosäure Alanin codiert [p.Val444Ala] (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Ausschnitt aus dem genetischen Code des BSEP-Proteins.** An der Position c.1331 führt der Polymorphismus zu einem Austausch von Thymin (T) zu Cytosin (C). Anstatt für Valin codiert das neu entstandene Triplett nun für Alanin (V444A).

Den Wildtyp stellt der TT-Genotyp dar, das heißt, das normale T-Allel ist auf beiden Chromosomen und damit homozygot zu finden. Der V444A-

Polymorphismus kann sowohl heterozygot (TC), als auch homozygot (CC) vorliegen (siehe Tab. 1).

Genotyp	Beschreibung
<b>TT</b>	Wildtyp
<b>TC</b>	Heterozygote Ausprägung des V444A-Polymorphismus
<b>CC</b>	Homozygote Ausprägung des V444A-Polymorphismus

**Tabelle 1: Wildtyp und Ausprägungen des V444A-Polymorphismus.**

### Häufigkeit

Tab. 2 gibt eine Übersicht über das Vorkommen des V444A-Polymorphismus in der Normalbevölkerung mit Zahlen aus den Datenbanken von 1000-Genome, Hap Map und EVS [21–23]. In Tab. 3 sind die Häufigkeiten des Gendefektes bei Kontrollgruppen aus verschiedenen publizierten Studien aufgelistet.

	1000 (n=1030) [21]	Genomes* Relativ	Hap Map** (n=224) [23]	Relativ	EVS*** [22]	(n=4115) Relativ
	Total		Total		Total	
<b>C-Allel</b>	1213	58,9 %	286	63,8 %	4941	60 %
<b>T-Allel</b>	847	41,1 %	162	36,2 %	3289	40 %

**Tabelle 2: Häufigkeit von V444A.**

\*) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=re&re=re2287622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=re&re=re2287622)

\*\*) <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.

\*\*\*) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=re&re=re2287622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=re&re=re2287622)

	Meier et al. [24] (n=205)		Müllenbach et al.[25] (n=413)		Dixon et al. [26] (n=261)	
	Total	%	Total	%	Total	%
<b>TT (VV)</b>	38	18,50 %	82	19,9 %	53	20 %
<b>TC (VA)</b>	101	49,30 %	195	47,2 %	133	51 %
<b>CC (AA)</b>	66	32,20 %	136	32,9 %	75	29 %
<b>C-Allel</b>	233	56,8 %	467	56,5 %	283	54 %
<b>T-Allel</b>	177	43,2 %	359	43,5 %	239	46 %

**Tabelle 3: Häufigkeit von V444A in der recherchierten Literatur.**

### **Auswirkungen**

Byrne et al. stellten 2009 in einem *in vitro*-Versuch beim Vorliegen eines C-Allels (A444) geringere BSEP-Proteinlevel im Vergleich zum T-Allel (V444) fest [27]. Meier et al. untersuchten den Zusammenhang von veränderter Transporterexpression in Zusammenhang mit genetischen Varianten und konnten feststellen, dass Träger des C-Allels eine geringere BSEP-Expression haben [24].

### **1.5.2. Intrahepatische Schwangerschaftscholestase und Kontrazeptiva-induzierte Cholestase**

In der Literatur wird ein Zusammenhang des V444A-Polymorphismus mit der Intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP, Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy) beschrieben. Diese tritt vor allem im letzten Schwangerschaftstrimenon auf und ist durch Cholestase, Pruritus und Ikterus gekennzeichnet. Im Labor findet man erhöhte GS-Spiegel; auch die AP (Alkalische Phosphatase) kann erhöht sein. Nach der Geburt verschwinden die Symptome spontan wieder. Zusätzlich geht die ICP mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburt und Fötusmortalität einher [28–30].

Es wird auch die Vermutung aufgestellt, dass die familiär gehäuft auftretende Kontrazeptiva-induzierte Cholestase (CIC, Contraceptive-induced Cholestasis) einen Zusammenhang mit V444A hat, jedoch war die Fallzahl zu klein um eine statistische Signifikanz nachweisen zu können [29].

### **1.5.3. Medikamenten-induzierte Cholestase**

In der Studie von Lang et al. [31] wurden PatientInnen mit Medikamenten-induzierter Leberschädigung auf genetische Veränderungen der Transportergene von MDR3 und BSEP untersucht. Die Studienpopulation war aufgeteilt in jene mit Medikamenten-induzierter Cholestase (Drug-induced cholestasis, DIC) und jene mit Medikamenten-induzierter Leberzellschädigung (Drug-induced hepatocellular injury, DH). Der V444A-Polymorphismus war signifikant häufiger bei Personen mit DIC als bei PatientInnen mit DH und gesunden Kontrollen.

### **1.5.4. Weitere Auswirkungen von V444A**

Eine Fallbeschreibung zeigt einen Patienten mit BRIC (benign recurrent intrahepatic cholestasis), der durch wiederkehrende cholestatische Episoden mit Ikterus und Pruritus auffiel, die jeweils auf Infektionen folgten, wie z.B. nach einer Entzündung der oberen Atemwege. Neben einer weiteren BSEP-Mutation wies der Patient auch den V444A-Polymorphismus auf [32].

Ein Einfluss von V444A wird weiterhin diskutiert im Zusammenhang mit:

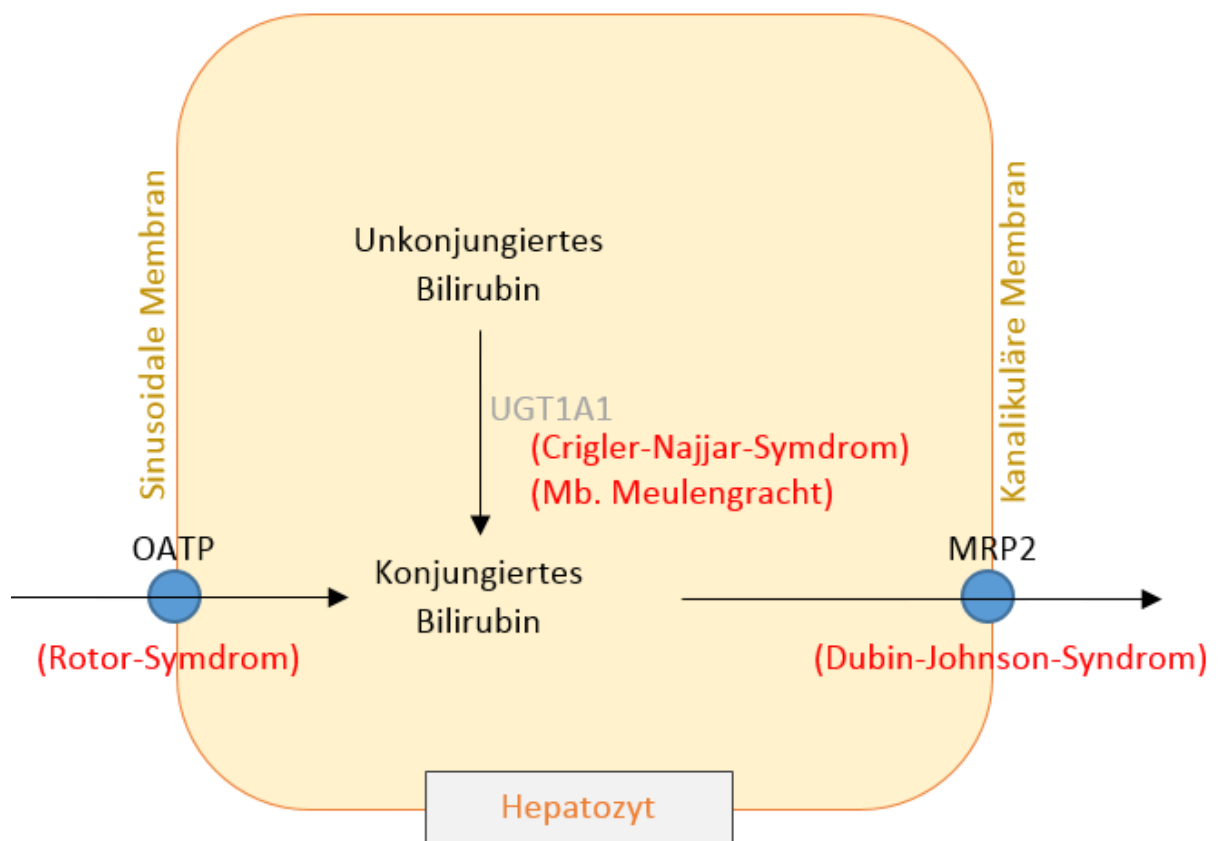
- Hepatitis C-Infektion [25]
- Therapieansprechen bei PatientInnen mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion [33]
- Severe Intrahepatic Cholestasis in Hodgkin's Lymphoma [34]

## **1.6. Cholestase**

Der Begriff „Cholestase“ bedeutet übersetzt eine Stauung der Galle. Die Störung des Galleflusses kann auftreten aufgrund von intrahepatischen Störungen oder wegen extrahepatischen Hindernissen, wie etwa einem Gallenstein, der die Gallenwege verlegt [17].

## **1.7. Bilirubin und Ikterus**

Bilirubin entsteht als Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin. Unkonjugiertes Bilirubin wird Albumin-gebunden in die Leber transportiert und dort mithilfe der UDP-Glucuronosyltransferase (GT1A1) an Glucuronsäure gekoppelt, man spricht nun von konjugiertem Bilirubin. Dieses kann über den MRP2-Transporter, der sich in der basolateralen Membran der Hepatozyten befindet, in die Galle sezerniert und so über den Darm ausgeschieden werden. Hyperbilirubinämie entsteht aufgrund prähepatischer (z.B. Hämolyse), intrahepatischer (z.B. Leberzirrhose) oder posthepatischer (z.B. Gallengangobstruktion) Störungen. Die Akkumulation von Bilirubin in Plasma und Gewebe führt zur Gelbfärbung von Skleren und Haut (Ikterus), wenn etwa der doppelte obere Grenzwert erreicht wird. Eine Störung im Abbau und in der Ausscheidung von Bilirubin kann auf unterschiedlichen Ebenen vorliegen (siehe Abb. 7). Ein Defekt in der UDP-Glukuronyltransferase (GT1A1) ist die Ursache für das Crigler-Najjar-Syndrom und Mb. Meulengracht (auch Gilbert-Syndrom genannt), wobei der Enzymdefekt beim Crigler-Najjar-Syndrom wesentlich stärker ausgeprägt ist. Durch die fehlende bzw. eingeschränkte Konjugation präsentieren sich die Syndrome durch einen erhöhten Spiegel von unkonjugiertem Bilirubin. Zu einer Hyperbilirubinämie mit vorwiegend konjugiertem Bilirubin kommt es beim Dubin-Johnson-Syndrom (Beeinträchtigung des MRP2-Transporters) und beim Rotor-Syndrom (Beeinträchtigung zweier OATP-Transporter in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten) [35–37].



**Abbildung 7: Bilirubin-Metabolismus in Hepatozyten und Störungen.** Das Abbauprodukt Bilirubin wird in die Hepatozyten transportiert, dort konjugiert und in die Galle ausgeschieden. Verschiedene Erkrankungen (rot) können zu einer eingeschränkten Funktion dieser einzelnen Schritte führen und Ursache einer Akkumulation von Bilirubin sein.

## 1.8. Erkrankungen mit Lebermitbeteiligung

### 1.8.1. Infekte

#### Epstein-Barr Virus

Der Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein DNA-Virus und gehört zur Gruppe der Herpesviren. Erstinfektionen im Kindesalter verlaufen typischerweise asymptomatisch bzw. werden aufgrund von sehr milden, grippeähnlichen Verläufen häufig nicht als solche erkannt. Bei etwa 95 % der Erwachsenen sind Antikörper gegen das Virus zu finden [38]. Nach einer Infektion persistiert das

Virus lebenslang in den B-Lymphozyten. Bei etwa der Hälfte der Jugendlichen und Erwachsenen präsentiert sich eine Primärinfektion als Bild der Infektiösen Mononukleose (IM), die meist mit den drei Symptomen Fieber, Pharyngitis und Lymphadenopathie einhergeht. Häufig zu beobachten sind unter anderem starke Halsschmerzen, allgemeines Krankheitsgefühl, geschwollene Lymphknoten an Hals und Nacken und belegte Tonsillen. Daneben werden bei etwa 33 % eine Splenomegalie und bei 25 % eine Hepatomegalie beschrieben [39]. Im Labor ist die IM oft gekennzeichnet durch eine Lymphozytose und dem Auftreten von atypischen Lymphozyten (Downey-Zellen) [38–41].

Bei 80 % der PatientInnen mit IM ist die Leber mitbetroffen, was sich meist in einem milden Anstieg der Lebertransaminasen zeigt, der aber niedriger ist, als normalerweise üblich bei einer aktiven viralen Hepatitis. Bei 90-95 % verläuft die Leberbeteiligung subklinisch, die klinische Manifestation einer Hepatitis ist selten. Die EBV-assoziierte Hepatopathie ist typischerweise selbstlimitierend. Ihre Ursache ist unklar, es wird darüber diskutiert, dass weniger das Virus selbst sondern die Immunreaktion des Organismus zu der Leberschädigung führt [42]. EBV-induzierte cholestatische Lebermitbeteiligungen mit erhöhten AP- und Bilirubinwerten sind unüblich, nur wenige Fälle [42–45] sind beschrieben, bei denen im Rahmen einer EBV-Erkrankung ein Ikterus auftritt. Dessen Pathogenese ist unklar, wobei geschwollene Gallengänge als Ursache diskutiert werden, eher als die Infektion der Epithelzellen der Gallengänge [39,45–47].

Die Übertragung von EBV findet zum Großteil über den Speichel bzw. das Epithel der Mundschleimhaut statt. Bei Kindern geschieht dies vor allem durch das Teilen von Gegenständen, die sie in den Mund nehmen. Bei Jugendlichen und Erwachsenen passiert es sehr häufig durch intimen Kontakt, was der IM den Beinamen „Kissing Disease“ eingebracht hat. Die Inkubationszeit beträgt etwa sechs Wochen. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend mit einer Dauer von circa 16 Tagen [39].

Therapiert wird die IM hauptsächlich symptomatisch mit dem Einsatz von Antipyretika und Analgetika, eine antivirale Therapie wird sehr selten angewandt [38,40].

### **1.8.2. Akute Lymphatische Leukämie**

Die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters. Sie ist charakterisiert durch eine Proliferation hämatopoetischer Zellen, welche die gesunden blutbildenden Zellen im Knochenmark verdrängen. Genetische, endogene und exogene Faktoren, und auch der Zufall spielen eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Obwohl ALL in jedem Alter auftreten kann, kommt sie hauptsächlich im Kindesalter vor, Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen. Die Symptome sind Folgen der eingeschränkten Blutbildung: Blässe, geschwächte Immunabwehr sowie Haut- und Schleimhautblutungen. 80 % der PatientInnen haben eine Lymphadenopathie, bei 75 % sind die Leber und/oder die Milz vergrößert. Ein Großteil der erkrankten Kinder können geheilt werden [48,49].

### **1.8.3. Cholezystolithiasis**

Cholezystolithiasis bezeichnet das Vorhandensein von Gallenkonkrementen in der Gallenblase. Die Gallensteine entstehen, wenn ein Ungleichgewicht der Gallekomponenten auftritt, ein Bestandteil nicht mehr in Lösung gehalten werden kann und ausfällt. Nach ihrer Zusammensetzung unterscheidet man Cholesterinsteine, Pigmentsteine, deren Hauptbestandteil Bilirubin ist, und gemischte Steine. Vor allem in den westlichen Industrienationen treten Gallensteine häufig auf, jedoch sind Träger zu einem großen Teil beschwerdefrei. Symptome entwickeln sich aufgrund einer Verlegung der Gallengänge durch einen Stein. PatientInnen mit symptomatischen Steinen präsentieren sich typischerweise mit Koliken oder Schmerzen im rechten Oberbauch und Epigastrium, begleitet von Übelkeit und Erbrechen. Die Prävalenz für die Steinbildung steigt mit dem Alter, Frauen sind annähernd doppelt so häufig betroffen wie Männer [50,51].

#### 1.8.4. Sonstige Erkrankungen

Die **Dermatomyositis** ist eine seltene Erkrankung, die sich mit peripherer Muskelschwäche und Hautveränderungen manifestiert [52]. Bei der **zystischen Fibrose**, einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, liegt eine Mutation eines Chloridkanals vor, die zu einer veränderten Zusammensetzung exokriner Drüsensekrete führt und vor allem die oberen und unteren Atemwege sowie den Verdauungstrakt betrifft. Etwa ein Drittel der PatientInnen haben eine Lebermitbeteiligung, wobei das Spektrum von einer neonatalen Cholestase, über erhöhte Transaminasen, Steatose und Fibrose bis hin zur Zirrhose reicht [53,54]. Bei der **Sichelzellanämie** führt ein durch Mutation verändertes Hämoglobin zu einer Verformung der Erythrozyten. Die roten Blutkörperchen verklumpen und führen zu einer Verlegung kleiner Gefäße [55]. Ein **hereditärer Alpha-1-Antitrypsin-Mangel** manifestiert sich mit Lungenemphysem und Leberzirrhose und zeigt im Labor erniedrigte Werte des Proteaseinhibitors Alpha-1-Antitrypsin [56].

## **Fragestellung**

**Hypothese 1:** PatientInnen, die den V444A-Polymorphismus tragen, haben unter gesunden Bedingungen keine Beeinträchtigung. Es besteht zwar durch die genetische Variation eine geringere Expression des BSEP-Transporters, jedoch reicht dessen Funktion für den GS-Transport aus. Kommt hingegen zusätzlich zu dem Polymorphismus („first hit“) noch ein weiterer Faktor, wie etwa eine EBV-Entzündung oder ein ALL-Schub („second hit“), hinzu, nimmt die Aktivität von BSEP weiter ab und der normale Transport kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Es kommt zur Cholestase.

**Hypothese 2:** Durch den V444A-Genpolymorphismus kommt es zu einer geringgradig modifizierten Galle-Zusammensetzung. Dadurch ist der GS-Pool in der Gallenblase verändert, was die Bildung von Steinen begünstigt.

## **2. Methoden**

### **2.1. PatientInnenrekrutierung**

In die Studie eingeschlossen wurden Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 18 Jahren, die im Zeitraum von Mai 2010 bis März 2014 an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz vorstellig wurden, und eine transiente, für den jeweiligen Krankheitsverlauf untypische Hyperbilirubinämie bzw. erhöhte Lebertransaminasen aufwiesen. Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und dem Vorliegen einer schriftlichen Einwilligung wurde eine Blutprobe entnommen, welche an das Institut für Humangenetik, Medizinische Universität Graz, versandt wurde. Dort erfolgte mittels PCR-Amplifikation und Sequenzierung die Analyse des V444A-Polymorphismus. Die Ergebnisse wurden den einsendenden ÄrztInnen zugeschickt, die den PatientInnen bzw. den Erziehungsberechtigten die Ergebnisse übermittelt haben. Außerdem erfolgten Screeninguntersuchungen bezüglich V444A bei PatientInnen mit Hepatopathie unklarer Genese.

#### **2.1.1. Einschlusskriterien**

- PatientInnen mit neu aufgetretener Hyperbilirubinämie im Rahmen eines Infektes (u.a. EBV)
- PatientInnen mit neu aufgetretener Hyperbilirubinämie im Rahmen einer Leukämie
- PatientInnen mit Gallensteinen
- PatientInnen mit unklarer Hepatopathie
- PatientInnen mit erhöhten Lebertransaminasen unklarer Genese
- Alter der PatientInnen: Geburt bis 18 Jahre
- Vorliegen einer schriftlichen und unterschriebenen Einverständniserklärung: Einverständnis zur genetischen Analyse und zur Verwendung der Daten für wissenschaftliche Zwecke

### **2.1.2. Ausschlusskriterien**

- PatientInnen mit einer neu aufgetretenen Hyperbilirubinämie, welche durch die Grunderkrankung erklärbar ist und sich im Rahmen eines typischen Krankheitsverlaufes befindet
- Fehlende Einverständniserklärung

## **2.2. Datenerhebung**

Es handelte sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive Aufarbeitung der PatientInnendaten. Hierbei war es das Ziel, die Ergebnisse zusammenzufassen, mit den klinischen Daten zu korrelieren und auf einen Zusammenhang zu überprüfen.

Nachdem die genetische Analyse abgeschlossen war, wurden über das Krankenhausinformationssystem „Medocs“ weitere Daten ergänzt. Neben der Hauptzielgröße und den Nebenzielgrößen (s.u.) wurden folgende Daten erhoben: Geburtsdatum der PatientInnen, Geschlecht, Datum der Blutentnahme, Definition der Erkrankung.

### **2.2.1. Hauptzielgröße**

Die Hauptzielgröße stellte der V444A-Status dar. Dabei gibt es drei Möglichkeiten:

- Homozygot TT (Wildtyp; auf beiden Allelen liegt an der Position c.1331 ein T vor)
- Heterozygot TC (auf einem Allel liegt an Position c.1331 ein T, auf dem anderen Allel ein C vor.)
- Homozygot CC (auf beiden Allelen liegt an der Position c.1331 ein C vor)

### **2.2.2. Nebenzielgrößen**

Als Nebenzielgrößen wurden ferner folgende Daten erhoben:

- Bilirubinspiegel im Serum (Norm: 0,10-1,20 mg/dl)
- Leberwerte
  - o ALT (Alanin-Aminotransferase, Norm: bis 35 U/l)
  - o AST (Aspartat-Aminotransferase, Norm: bis 30 U/l)
  - o GGT (Gamma Glutamyl-Transferase, Norm: bis 38 U/l)
  - o LDH (Laktatdehydrogenase, Norm: 120-240 U/l)
  - o CHE (Cholinesterase, Norm: 3900-11000 U/l)
  - o AP (Alkalische Phosphatase, Norm: 35-105U/l)
- Entzündungsparameter (CRP, C-reaktives Protein, Norm: bis 5 mg/l)
- Symptomatik der untersuchten PatientInnen

### **2.3. Auswertung und Statistik**

Bei dieser Diplomarbeit handelte es sich um eine Pilotstudie. Dadurch weist sie nur eine sehr geringe Anzahl an PatientInnen auf und es gibt auch keine Kontrollgruppe.

Die primäre Auswertung erfolgte deskriptiv. Die Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Außerdem wurde Excel zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen verwendet.

Das Ziel der Arbeit war es, einen Überblick über die Ergebnisse zu bekommen und Tendenzen ausfindig zu machen, um herauszufinden, ob eine Weiterführung der Studie erfolgversprechend sei und mehr Informationen für deren Planung zu erhalten. Der 2x2 Fisher Exact Test wurde herangezogen, um die Häufigkeit des C-Allels mit bekannten Werten in der Normalbevölkerung zu vergleichen. Ein p-Wert kleiner 0,05 wird als statistisch signifikant angesehen.

## **2.4. Ethik**

Die Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vorgestellt. Von dieser wurden keine Einwände gegen die Durchführung der Studie erhoben. Die EK-Nummer des Votums vom 25. September 2014 lautet 27-004 ex 14/15.

## **2.5. Erhebung des genetischen Status**

Der genetische Polymorphismus (c.1331T>C [p.V444A], BSEP) wurde mittels Sanger Sequenzierung bestimmt. Dazu wurden 4 ml EDTA-Vollblut der PatientInnen an das Institut für Humangenetik versandt. Im Zuge der Routinediagnostik wurde meist der gesamte codierende Bereich des *BSEP*-Gens (28 Exons; Exon 1 ist nicht codierend) sequenziert. Indikationsbedingt wurde teilweise nur das Exon 13, in dem der V444A-Polymorphismus lokalisiert ist, analysiert.

### 3. Ergebnisse

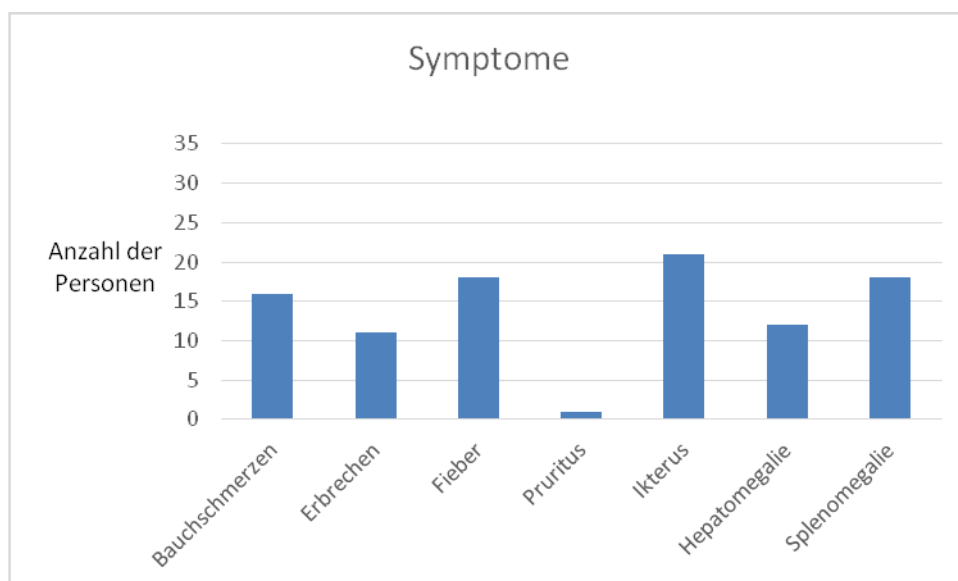
#### 3.1. PatientInnencharakterisierung

Die Tab. 4 gibt einen Überblick über die PatientInnen, bei denen eine Genotypisierung des V444A-Genpolymorphismus durchgeführt wurde. Die Fallzahl ergibt sich aus den analysierten Proben in dem angegebenen Zeitraum. Es war auch Aufgabe dieser Diplomarbeit festzustellen, ob die Fallzahl für eine eindeutige Aussage ausreichend ist, oder ob der Beobachtungszeitraum verlängert werden muss, um die Fallzahl zu vergrößern. Insgesamt konnten 39 PatientInnen für die Studie gewonnen werden, wobei das Geschlechterverhältnis beinahe ausgeglichen ist. Auch bezüglich des Alters zeigt das Kollektiv eine sehr große Bandbreite. Die jüngsten PatientInnen wurden bereits im ersten Lebensjahr auffällig, die ältesten noch in die Studie eingeschlossenen PatientInnen waren im 18. Lebensjahr. In der Tabelle kann man auch erkennen, dass es sich bei den PatientInnen im Hinblick auf die Grunderkrankung um eine sehr heterogene Gruppe handelt.

Krankheit	Anzahl	Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)
ALL	3	(2/1)	11,9 ± 6
EBV	9	(2/7)	16,1 ± 1,5
Varizellen und/oder Scharlach	2	(0/2)	10,3 ± 10,6
Hepatitis A	2	(1/1)	15,5 ± 1,9
Cholezystolithiasis	7	(2/5)	13,1 ± 5,1
Hepatopathie unklarer Genese	10	(8/2)	6,8 ± 6,6
Alpha1-Antitrypsinmangel	1	(1/0)	0,1
Dermatomyositis	1	(0/1)	9,8
PFIC	1	(1/0)	1,2
Sekundär-sklerosierende Cholangitis	1	(1/0)	0,2
Sichelzellanämie	1	(0/1)	7,9
Zystische Fibrose	1	(1/0)	9,8
Summe	2	(19/20)	10,8 ± 6,4

**Tabelle 4: PatientInnencharakterisierung.** Das Alter ist angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung.

Die Studienpopulation, die für diese Studie gescreent wurde, zeigte ein sehr heterogenes Bild an Symptomen. In erster Linie war das Ziel der Studie zwar, einen Zusammenhang zwischen Hyperbilirubinämie im Rahmen einer EBV- oder ALL-Erkrankung und dem V444A-Genpolymorphismus zu zeigen, aber gleichzeitig wurde versucht zu eruieren, ob es weitere Symptome, wie etwa erhöhte Transaminasen, Hepatomegalie u.a. gibt, die mit dem V444A-Polymorphismus assoziiert werden können. In Abb. 8 sind die Symptome angeführt, die die PatientInnen präsentierten, und die zu einer Analyse der Genetik führten. Dabei handelt es sich um die häufigsten Symptome, die die PatientInnen zeigten, abgesehen von den krankheitstypischen Symptomen ihrer Grunderkrankung. Bei 21 PatientInnen war an der Haut oder an den Skleren ein Ikterus zu erkennen. Ein einziger Patient präsentierte sich mit Juckreiz. Die Leber war bei 12 Kindern, die Milz bei 18 Kindern laut Ultraschallbefund vergrößert. Weitere häufige Symptome waren Bauchschmerzen, Erbrechen und Fieber.



**Abbildung 8: Häufige Symptome in der Studienpopulation.**

In der gesamten gescreenten Gruppe gab es 15 Personen (39 %) mit homozygoter Ausprägung des V444A-Genpolymorphismus, bei 14 Personen (37 %) war er heterozygot nachzuweisen und bei 9 Kindern (24 %) lag er nicht vor (siehe Abb. 9). Dies entspricht einer Gesamthäufigkeit des C-Allels von 0,579 in der Studienpopulation.

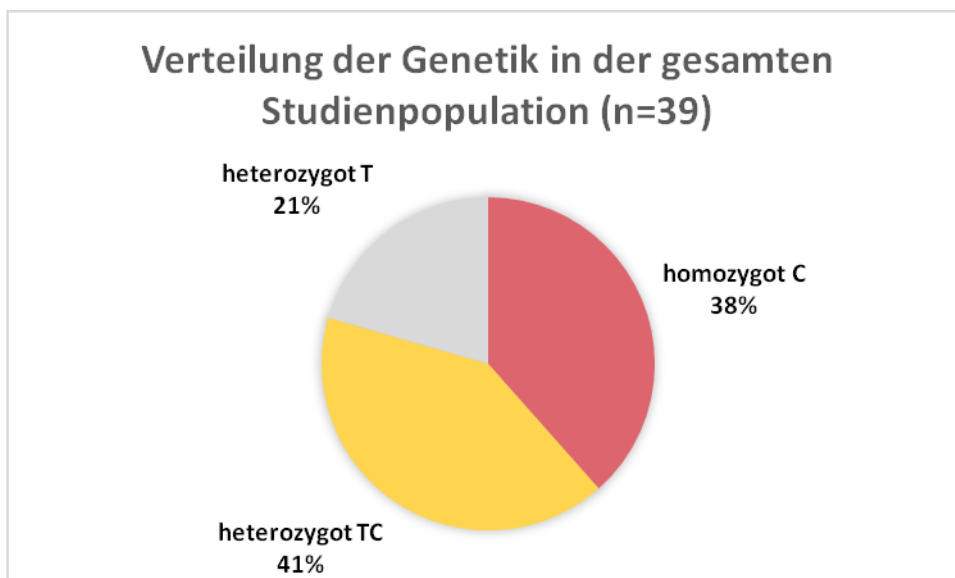


Abbildung 9: Verteilung der Ausprägung von V444A in der gesamten Studienpopulation.

## 3.2. Auswertung nach Krankheiten

### 3.2.1. Akute Lymphatische Leukämie

Das PatientInnengut in der Gruppe der ALL war sehr klein mit nur 3 Kindern, davon waren zwei männlich und eines weiblich. Der Altersdurchschnitt betrug 11,9 Jahre.

M/F	Alter	V444A Status	Bili ges (mg/dl)	AP (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	AST=GOT (U/l)	ALT=GPT (U/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
M	15,8	CC	5,90	75	21	2799	25	80	224	0,6
M	14,9	CC	19,17	160	80	4323	1195	2058	317	48,8
F	5,0	TC	0,8				242	394		

Tabelle 5: Laborparameter von PatientInnen mit Akuter Lymphatischer Leukämie.

Zwei der ALL-Patienten wurden aufgrund einer ungeklärten Hyperbilirubinämie auf V444A gescreent, die dritte Patientin war klinisch wegen ihrer erhöhten Transaminasen auffällig gewesen. Alle drei Kinder hatten den V444A-Polymorphismus ausgeprägt, zwei davon homozygot, eines heterozygot (siehe Abb. 10). Prozentuell gesehen lag die Häufigkeit für die Allelausprägung CC bei 76 % und jene für TC bei 33 %. Der Wildtyp TT kam in der Gruppe der ALL-

Erkrankten gar nicht vor (siehe Abb. 10). Dies bedeutet eine Allelhäufigkeit von C von 0,833. Statistisch konnte bei der kleinen Gruppe keine Relevanz bei einem Vergleich der C-Allelhäufigkeit mit den Kontrollgruppen nachgewiesen werden (siehe Tab. 6).

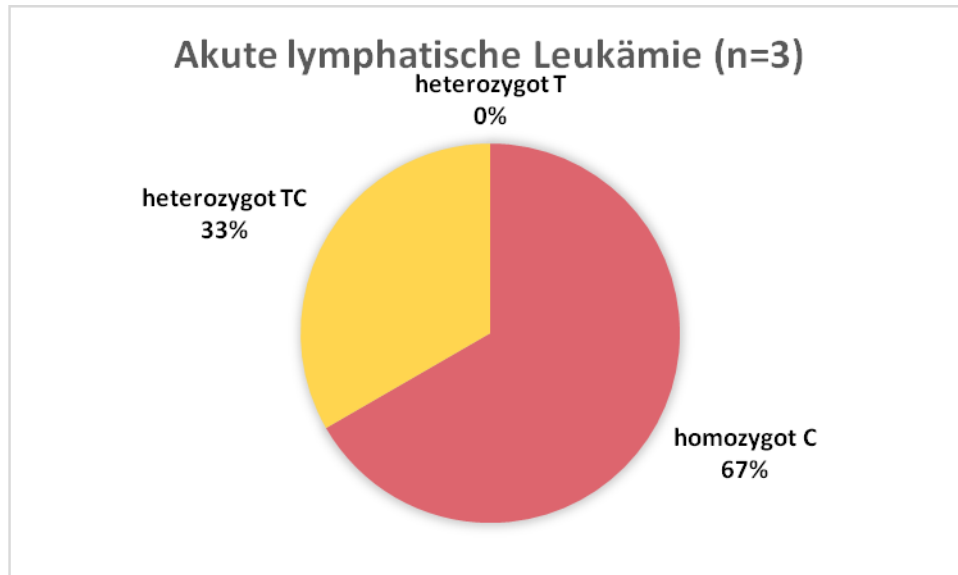


Abbildung 10: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Akuter Lymphatischer Leukämie.

**Akute Lymphatische Leukämie (n=3)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,4268	0,4106	0,4124

Tabelle 6: p-Werte für ALL. Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei Akuter Lymphatischer Leukämie im Vergleich zu Kontrollgruppen

Die beiden Patienten mit den höchsten Bilirubinspiegeln wurden homozygot auf V444A getestet. In Abb. 11 ist zu erkennen, dass der Mittelwert des Bilirubinspiegels bei der homozygoten Ausprägung CC um ein Vielfaches höher ist als bei der heterozygoten Ausprägung TC, wobei zu beachten ist, dass es sich hierbei nur um drei PatientInnen handelt.

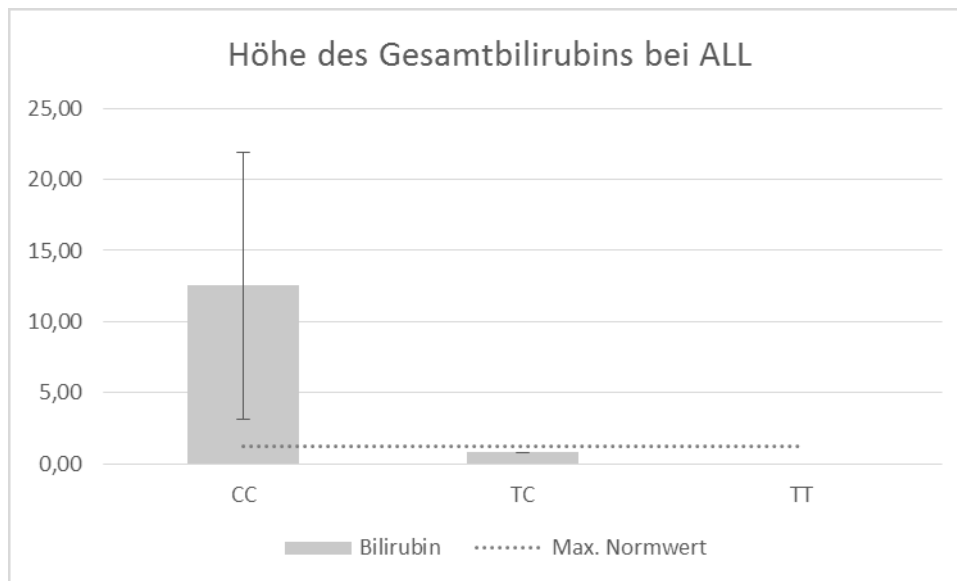


Abbildung 11: Höhe des Gesamtbilirubins bei Akuter Lymphatischer Leukämie nach Genetik.

### 3.2.2. Epstein-Barr-Virus-Infektion

Unter den neun EBV-PatientInnen waren sieben Mädchen und zwei Buben, der Altersschnitt betrug 16,1 Jahre. Die meisten fielen in der Klinik vor allem durch ein ikterisches Erscheinungsbild auf, welches auch im Labor als Hyperbilirubinämie verifiziert wurde, auf zwei PatientInnen war man primär aufgrund erhöhter Lebertransaminasen und erhöhtem LDH aufmerksam geworden. Auch bei den beiden PatientInnen, die primär nicht durch einen Ikterus auffällig wurden, konnten im Labor erhöhte Bilirubinwerte festgestellt werden (siehe Tab. 7).

M/F	Alter	V444A Status	Bili ges (mg/dl)	AP (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	AST= GOT (U/l)	ALT=GPT (U/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
F	13,9	CC	14,93		135	5322	142	171	918	12,1
F	16,3	CC	8,34	285	160	3838	232	174	552	7,4
F	17,2	TT	6,58	267	128	4260	117	114	536	13
F	17,1	TC	5,9					1600		
M	15,0	TC	5,20		138	5156	192	288	708	46,3
F	16,7	TC	3,11		214	5254	533	335	834	10,6
M	17,6	TC	2,19	204	82	5319	83	190	549	5
F	13,8	TC	1,90	794	309	4705	246	466	604	4,4
F	17,5	TC	1,37	376	223	5409	178	111	942	43

Tabelle 7: Laborparameter von PatientInnen mit EBV-Infektion.

Acht der neun Kinder hatten den V444A-Polymorphismus entweder homozygot oder heterozygot ausgeprägt, ein Kind wies das Wildtypallel auf. Interessant zu erkennen ist, dass die beiden Kinder mit den höchsten Bilirubinspiegeln auch eine homozygote Ausprägung der Sequenzvariante haben.

In dieser Gruppe trat der V444A-Polymorphismus bei 2 PatientInnen (22 %) in homozygoter Form und bei sechs PatientInnen (67 %) in heterozygoter Form TC auf. Bei einer Patientin (11 %) war der Gendefekt nicht nachzuweisen (siehe Abb. 12). Die Häufigkeit des C-Allels beträgt 0,563. Die Anzahl an PatientInnen in dieser Gruppe ist wiederum sehr klein, die Verteilung der Genetik war nicht relevant verändert im Vergleich zu den Kontrollgruppen (siehe Tab. 8).

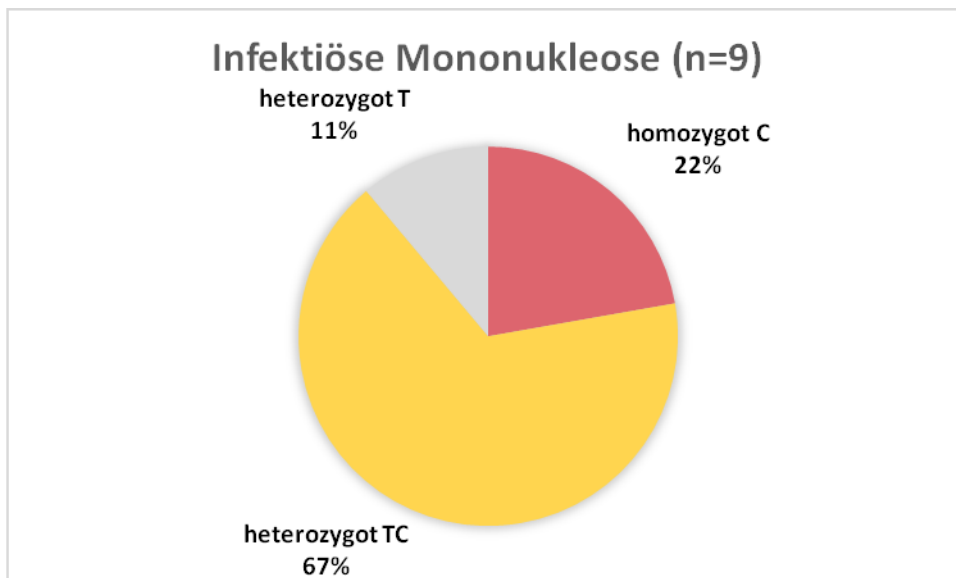


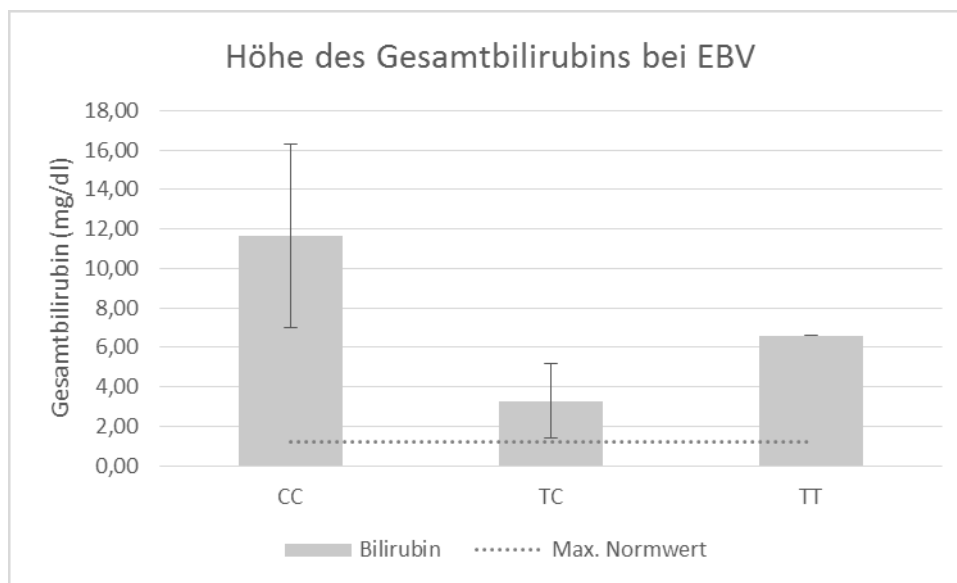
Abbildung 12: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit EBV-Infektion.

**EBV (n=9)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,4659	0,4659	0,8106

**Tabelle 8: p-Werte für EBV.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei Infektiöser Mononukleose im Vergleich zu Kontrollgruppen.

In der Abb.13 wurden die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung des Gesamtbilirubins der drei möglichen genetischen Ausprägungen (CC, TC und TT) berechnet und dargestellt. Am höchsten ist der Gesamtbilirubindurchschnittswert in der Gruppe „homozygot CC“ mit 11,64 mg/dl. Der Mittelwert der Gruppe TC liegt mit 2,75 mg/dl ebenfalls über dem Normbereich. Der Mittelwert bei der Gruppe TT ist zu vernachlässigen, da diese Gruppe nur aus einer Person besteht.



**Abbildung 13: Höhe des Gesamtbilirubins bei EBV-Infektion nach Genetik.**

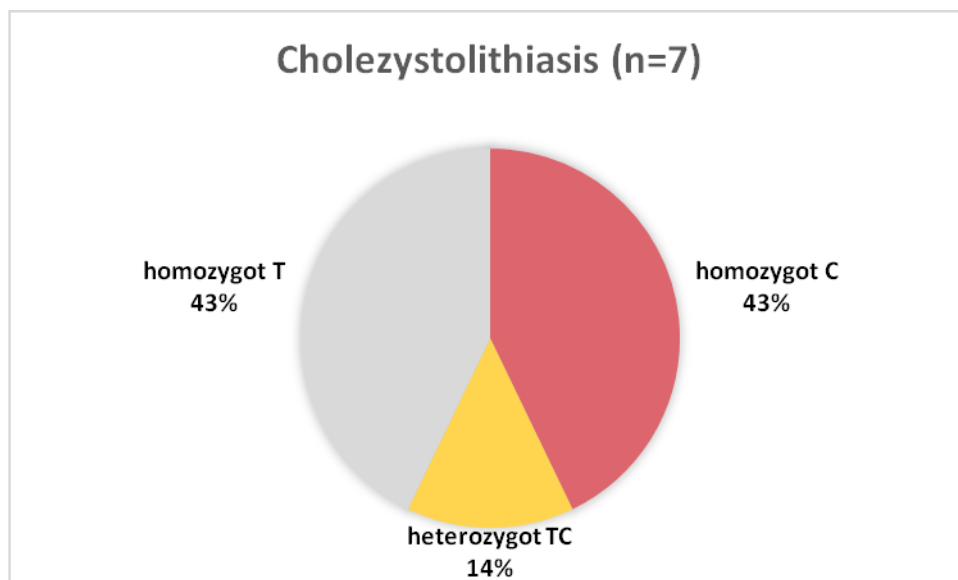
### 3.2.3. Cholezystolithiasis

In der Gruppe der Kinder mit Cholezystolithiasis waren mehr Mädchen als Buben (Geschlechterverhältnis männlich:weiblich ist 2:5). Der Altersdurchschnitt betrug 13,1 Jahre (siehe Tab. 9). Beinahe alle PatientInnen klagten über Bauchschmerzen und Übelkeit bzw. Erbrechen. Zwei Kinder wiesen zusätzlich einen Ikterus auf, wovon eines außerdem an Pruritus litt.

M/F	Alter	V444A Status	Bili ges (mg/dl)	AP (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	AST= GOT (U/l)	ALT=GPT (U/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
M	17,3	CC	12,25	321	300	8118	106	239	247	1,3
F	15,8	TC	8,75	156	358	8533	123	359	221	2,9
F	14,8	TT	2,58	217	479	9396	515	639	386	5,8
F	12,8	CC	1,86	207	10	6772	23	13	226	17,3
F	13,4	TT	1,56	231	573	7861	155	557	214	2,6
M	15,5	CC	0,71	184	461	9139	232	378	246	1,1
F	1,9	TT	0,65	148	10	5023	33	16	350	329,5

**Tabelle 9: Laborparameter von PatientInnen mit Cholezystolithiasis.**

Von sieben Kindern wiesen den V444A-Polymorphisms drei homozygot und eines heterozygot auf, bei drei PatientInnen war er nicht vorhanden (siehe Abb. 14). Die Häufigkeit des C-Allels in dieser Gruppe betrug 50 %, statistisch zeigte sich keine signifikante Verschiebung der Allelfrequenz im Vergleich zur Normalbevölkerung (siehe Tab. 10). Die beiden PatientInnen mit deutlich erhöhtem Bilirubinspiegel über 3 mg/dl waren beide Träger des Polymorphismus.



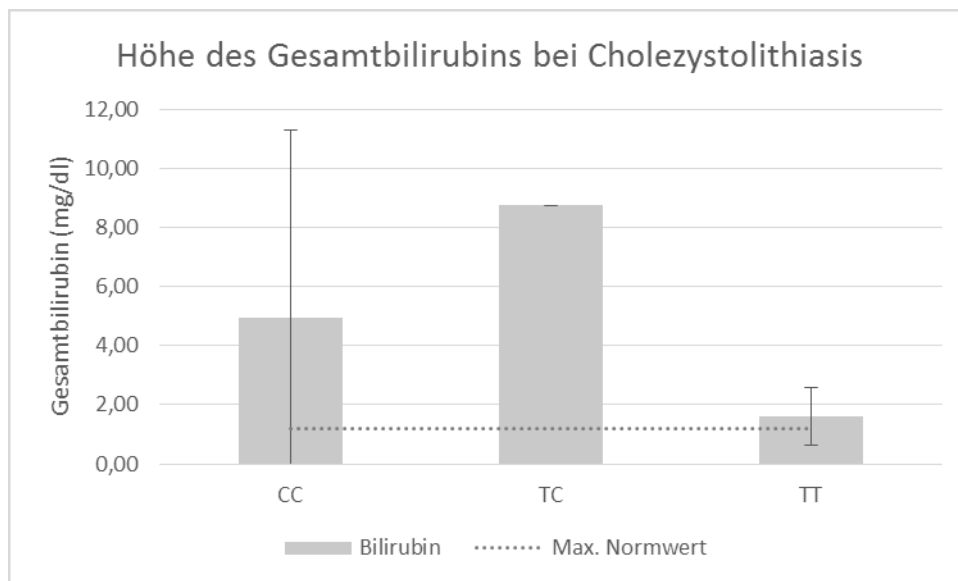
**Abbildung 14: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Cholezystolithiasis.**

### **Cholezystolithiasis (n=7)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,3982	0,5891	0,5864

**Tabelle 10: p-Werte für Cholezystolithiasis.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei Cholezystolithiasis im Vergleich zu Kontrollgruppen.

In Abb. 15 sind die PatientInnen wiederum nach der Höhe des gemessenen Bilirubins geordnet, die homozygoten Träger des Polymorphismus zeigten im Mittel höhere Werte als die Träger des Wildtyps. Die Gruppe der heterozygoten Träger ist zu vernachlässigen, da sie nur aus einer Person besteht.



**Abbildung 15: Höhe des Gesamtbilirubins bei Cholezystolithiasis nach Genetik.**

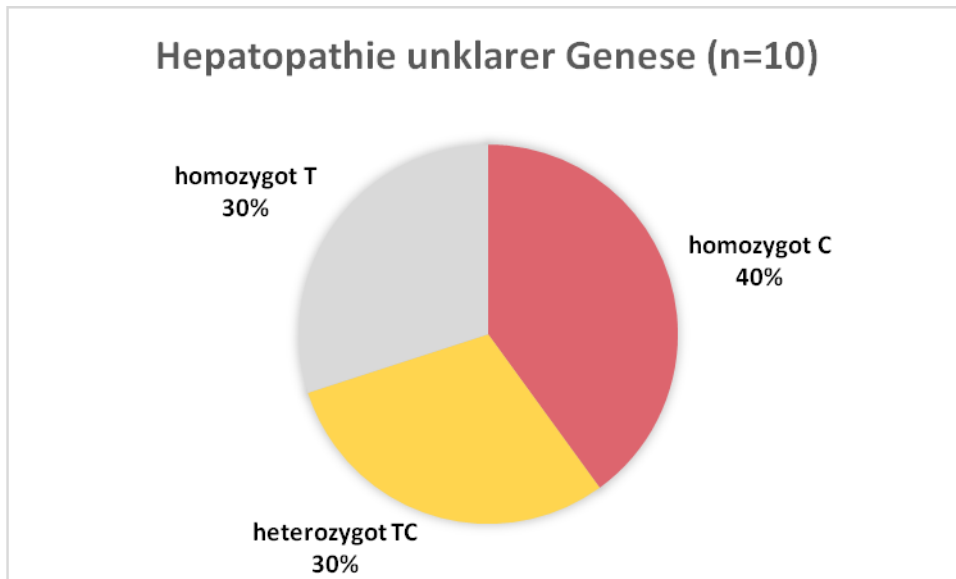
### **3.2.4. Hepatopathie unklarer Genese**

Wurden auf der Kinderklinik PatientInnen mit Leberpathologien vorstellig, die nicht eindeutig einer bekannten Krankheit zugeschrieben werden konnten bzw. deren Ursache man nicht eruieren konnte, wurde ebenfalls der V444A-Genotyp ermittelt. Dies war der Fall bei zwei Mädchen und acht Buben.

M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges (mg/dl)	AP (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	AST=GOT (U/l)	ALT=GPT (U/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
M	2,2	Akutes Leberversagen unkl. Genese	TT	18,52	526	218	4793	2675	2115	489	5,1
M	0,1	Riesenzellhepatitis	CC	10,5	368	188	7654	81	37	321	0,6
M	0,3	Intra- und extrahepatische Gallengangshypoplasie	TC	7,96	665	27	4189	94	56	300	3
M	14,8	Hepatitis unkl. Genese	CC	7,09	360	247	9832	173	347	278	25,9
M	3,3	Akutes Leberversagen unklar. Genese	CC	7,07		201	4538	1884	1903	514	4,7
M	14,5	Hepatopathie unkl. Genese	TT	3,00		138	6068	137	164	369	67,0
M	3,7	Leberzirrhose und Gallengangshypoplasie	CC	1,08	431	250	8294	141	99	273	5
F	12,4	Fettleber mit Transam.-Erhöhung	TC	0,92	201	25	10329	59	124	235	0,6
M	1,4	Hepatopathie unkl. Genese	TT	0,89	595	250	7908	375	450	355	5
F	15,3	Chron. Hepatopathie unkl. Genese	TC	0,73		257	9507	54	187	180	0,6

**Tabelle 11: Laborparameter von PatientInnen mit Hepatopathie unklarer Genese.**

Zwischen den vorliegenden Fällen mit nicht geklärter Hepatopathie und dem V444A-Polymorphismus war kein Zusammenhang zu entdecken. Der Gendefekt trat nicht signifikant häufiger auf als in der Normalbevölkerung (siehe Tab. 12). Auch die Höhe der Bilirubinwerte scheint tendenziell nicht im Zusammenhang mit der Genetik zu liegen (siehe Abb. 17). Vier Patienten mit homozygoter und drei PatientInnen mit heterozygoter Ausprägung befanden sich in der Gruppe, drei Kinder besaßen den Genotyp TT (siehe Abb. 16).

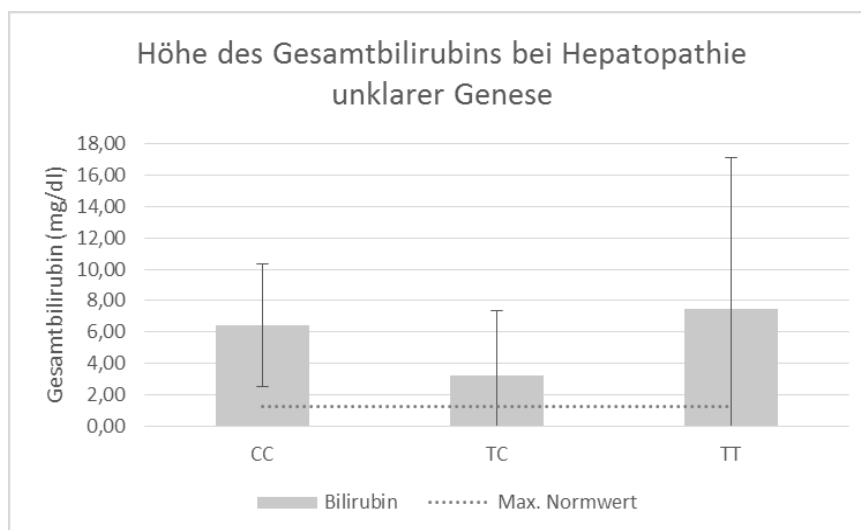


**Abbildung 16:** Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit Hepatopathie unklarer Genese.

**Hepatopathie unklarer Genese (n=10)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,4789	0,8204	0,6539

**Tabelle 12: p-Werte für Hepatopathie unklarer Genese.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei Hepatopathie unklarer Genese im Vergleich zu Kontrollgruppen.



**Abbildung 17:** Höhe des Gesamtbilirubins bei Hepatopathie unklarer Genese nach Genetik.

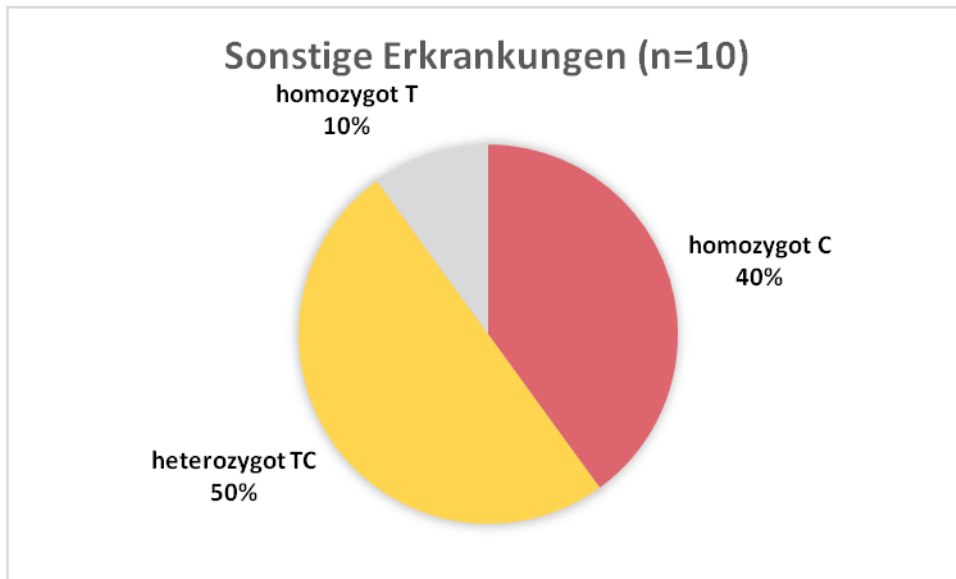
### 3.2.5. Andere Erkrankungen

In dieser Gruppe wurden alle Krankheiten zusammengefasst, die nur bei einem oder zwei PatientInnen auftraten. Sechs Kinder waren aufgrund einer Hyperbilirubinämie gescreent worden, vier weitere aufgrund von erhöhten Transaminasen.

M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges (mg/dl)	AP (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	AST= GOT (U/l)	ALT= GPT (U/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
M	1,2	PFIC	CC	26,17	414	58	3591	1024	226	271	8,6
F	7,9	Sichelzellanämie	CC	19,61	363	36	3318	255	303	1269	13,1
M	0,2	Sekundär sklerosierende Cholangitis	CC	12,53	1028	3502	7254	168	121	273	22,2
M	14,1	Hepatitis A	TC	6,39	618	73	6731	280	754	256	0,6
F	16,8	Hepatitis A	TC	5,06		129	6098	269		269	2,0
M	0,1	Alpha1-Antitrypsin-Mangel	TC	4,37	1171	1307	7373	114	54	338	<2,0
F	2,8	Varizellen und Scharlach	TC	1,01		111	7063	93	58	332	49,3
F	9,8	Dermatomyositis	TC	0,43	99	43	7312	374	254	508	0,9
M	9,8	Zystische Fibrose	CC	0,38		193	9203	477	630	383	5,1
F	17,8	Scharlach	TT	0,27		139	4654	54	49	185	93,5

**Tabelle 13: Laborparameter von PatientInnen mit sonstigen Erkrankungen.**

Von zehn PatientInnen waren neun Träger des V444A-Polymorphismus, davon vier homozygote (CC) und fünf heterozygote (TC). Nur eine Patientin wies die Wildtyp-Form TT auf (siehe Abb. 18). Die Häufigkeit des C-Allels in dieser Gruppe betrug 65 %, im Vergleich zur Normalbevölkerung war der Unterschied nicht statistisch signifikant (siehe Tab. 14). Aber auch hier war wieder zu beobachten, dass Kinder mit sehr stark erhöhten Bilirubinwerten homozygot CC waren und alle PatientInnen mit einer Hyperbilirubinämie den Gendefekt zumindest heterozygot aufwiesen.



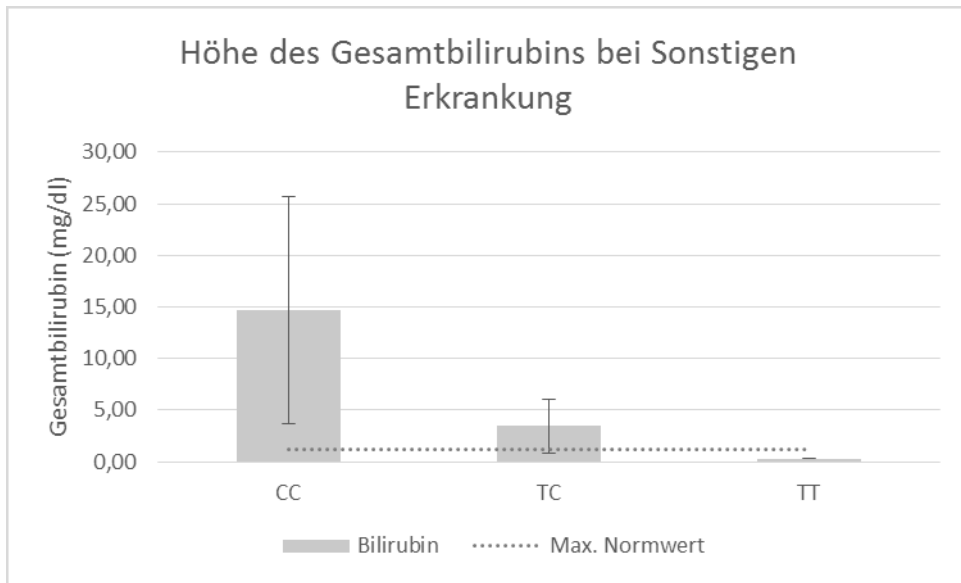
**Abbildung 18: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit sonstigen Erkrankungen.**

**Sonstige Erkrankungen (n=10)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	1	0,6534	0,8201

**Tabelle 14: p-Werte für sonstige Erkrankungen.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei sonstigen Erkrankungen im Vergleich zu Kontrollgruppen.

Auch der Vergleich der mittleren Bilirubinwerte, aufgeteilt nach unterschiedlichen Genotypen, ergab, dass Kinder mit homozygotem Genotyp (CC) einen mehr als viermal höheren Mittelwert haben als Kinder mit heterozygotem Genotyp (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19: Höhe des Gesamtbilirubins bei sonstigen Erkrankungen nach Genetik.**

### 3.3. Symptomorientierte Auswertung

Ein ikterisches Erscheinungsbild war die häufigste Ursache, welche zur Auswertung der Genetik bezüglich des V444A-Polymorphismus führte. Herauszufinden, ob die Hyperbilirubinämie in Zusammenhang mit dem Gen-Polymorphismus liegt, war eine wesentliche Frage dieser Studie. Es sollte auch ermittelt werden, ob es weitere Symptome gibt, wie etwa erhöhte Transaminasen, erhöhte Leberenzyme oder Hepatomegalie, die in Kombination mit der Sequenzveränderung gehäuft auftreten.

#### 3.3.1. Hyperbilirubinämie

Das Phänomen, das zu dieser Studie führte, war die Beobachtung ikterischer Kinder im Rahmen einer EBV- oder ALL-Erkrankung. Es sollte eruiert werden, ob der V444A-Genpolymorphismus, der in Zusammenhang mit Schwangerschafts-Cholestase und Medikamenten-induzierter Cholestase gebracht wird, auch bei dieser Form der klinischen Beobachtungen eine Rolle spielt.

In Tab. 15 sind alle PatientInnen, die für diese Studie gescreent wurden, gereiht nach der Höhe ihres Bilirubinspiegels gelistet. Es ist zu erkennen, dass die homozygote Form CC besonders häufig ist bei sehr hohen Bilirubinspiegeln, während die Wildform TT häufiger wird, je niedriger der Bilirubinspiegel ist.

Nr.	M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges
31	M	1,2	PFIC	CC	26,17
33	F	7,9	Sichelzellanämie	CC	19,61
2	M	14,9	ALL	CC	19,17
23	M	2,2	Akutes Leberversagen unklarer Genese	TT	18,52
4	F	13,9	EBV	CC	14,93
32	M	0,2	Sekundär sklerosierende Cholangitis	CC	12,53
21	M	17,3	Cholezystolithiasis	CC	12,25
35	M	0,1	Riesenzellhepatitis	CC	10,5
22	F	15,8	Cholezystolithiasis	TC	8,75
7	F	16,3	EBV	CC	8,34

37	M	0,3	Gallengangshypoplasie	TC	7,96
26	M	14,8	Hepatitis unklarer Genese	CC	7,09
24	M	3,3	Akutes Leberversagen unklarer Genese	CC	7,07
8	F	17,2	EBV	TT	6,58
14	M	14,1	Hepatitis A	TC	6,39
1	M	15,8	ALL	CC	5,90
5	M	15,0	EBV	TC	5,20
15	F	16,8	Hepatitis A	TC	5,06
29	M	0,1	Alpha1-Antitrypsin-Mangel	TC	4,37
10	F	16,7	EBV	TC	3,11
28	M	14,5	Hepatopathie unklarer Genese	TT	3,00
20	F	14,8	Cholezystolithiasis	TT	2,58
11	M	17,6	EBV	TC	2,19
6	F	13,8	EBV	TC	1,99
16	F	12,8	Cholezystolithiasis	CC	1,86
18	F	13,4	Cholezystolithiasis	TT	1,56
9	F	17,5	EBV	TC	1,37
36	M	3,7	Leberzirrhose und Gallengangshypoplasie	CC	1,08
12	F	2,8	Varizellen und Scharlach	TC	1,01
27	M	1,4	Hepatopathie unklarer Genese	TT	0,89
3	F	5,0	ALL	TC	0,8
25	F	15,3	Chron. Hepatopathie unklarer Genese	TC	0,73
19	M	15,5	Cholezystolithiasis	CC	0,71
17	F	1,9	Cholezystolithiasis	TT	0,65
30	F	9,8	Dermatomyositis	TC	0,43
34	M	9,8	Zystische Fibrose	CC	0,38
13	F	17,8	Scharlach DD Toxic Shock Syndrom	TT	0,27
39	F	17,1	Fettleber, Hepatopathie unklarer Genese	TC	5,90

**Tabelle 15: Übersicht über die Studienpopulation gereiht nach der Höhe ihrer Bilirubinpiegel.**

Um eine bessere Übersicht zu erlangen, wurde das PatientInnenkollektiv in vier Gruppen unterteilt:

- Gruppe 1: Sehr stark erhöhte Bilirubinwerte (>10 mg/dl)
- Gruppe 2: Stark erhöhte Bilirubinwerte (>3 mg/dl und ≤ 10 mg/dl)
- Gruppe 3: Mäßig erhöhte Bilirubinwerte (> 1,2 mg/dl und ≤ 3 mg/dl)
- Gruppe 4: Normale Bilirubinwerte (>0,1 mg/dl und ≤1,2 mg/dl)

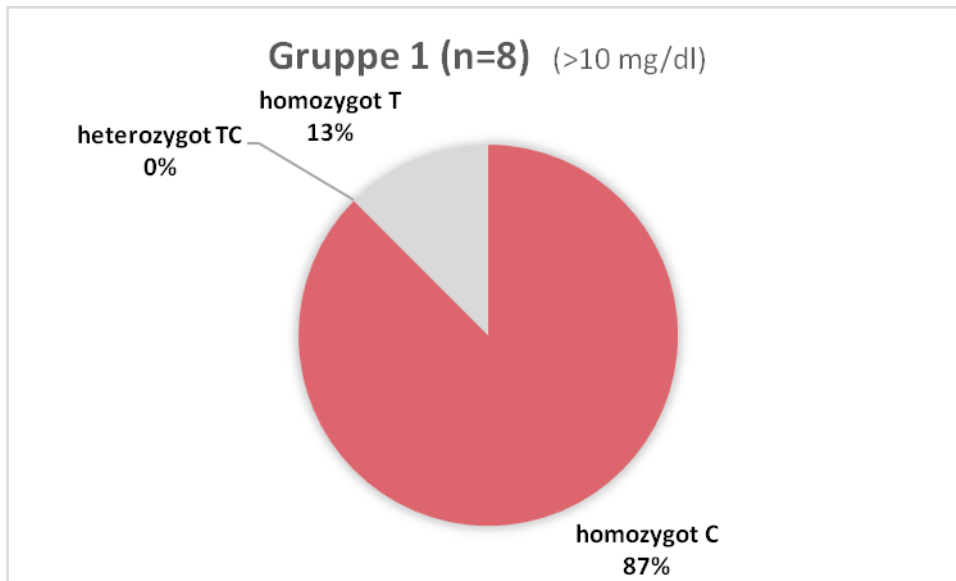
## Gruppe 1

In der ersten Gruppe mit stark erhöhten Bilirubinwerten über 10 mg/dl hatten bis auf einen Patienten alle eine homozygote Ausprägung des V444A-Genpolymorphismus. Die jeweils zugrundeliegende Erkrankung zeigt eine sehr heterogene Durchmischung. Von den acht PatientInnen in dieser Gruppe waren zwei weiblich und sechs männlich (siehe Tab. 16).

Nr.	M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges
31	M	1,2	PFIC	CC	26,17
33	F	7,9	Sichelzellanämie	CC	19,61
2	M	14,9	ALL	CC	19,17
23	M	2,2	Akutes Leberversagen unklarer Genese	TT	18,52
4	F	13,9	EBV	CC	14,93
32	M	0,2	Sekundär sklerosierende Cholangitis	CC	12,53
21	M	17,3	Cholezystolithiasis	CC	12,25
35	M	0,1	Riesenzellhepatitis	CC	10,5

**Tabelle 16: Übersicht über PatientInnen mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie.** In die Gruppe 1 fallen PatientInnen mit einer Hyperbilirubinämie (>10 mg/dl).

Wie in der Abb. 20 zu erkennen ist, wird die Gruppe mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie durch das Auftreten der homozygoten Form CC dominiert. Diese kommt zu 87 % vor, während die heterozygote Form TC gar nicht vertreten ist. Ein Kind zeigte trotz des TT Genotyps (Wildtyp) eine stark erhöhte Hyperbilirubinämie. Die Häufigkeit des C-Allels in dieser Gruppe beträgt 0,875. Dies ist signifikant höher im Vergleich zu den Daten über die Normalbevölkerung von 1000 Genomes und EVS (siehe Tab. 17).



**Abbildung 20: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie.**

**Gruppe 1 (n=8)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,06251	0,02102	0,03727

**Tabelle 17: p-Werte für Gruppe 1.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei PatientInnen mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie im Vergleich zu Kontrollgruppen.

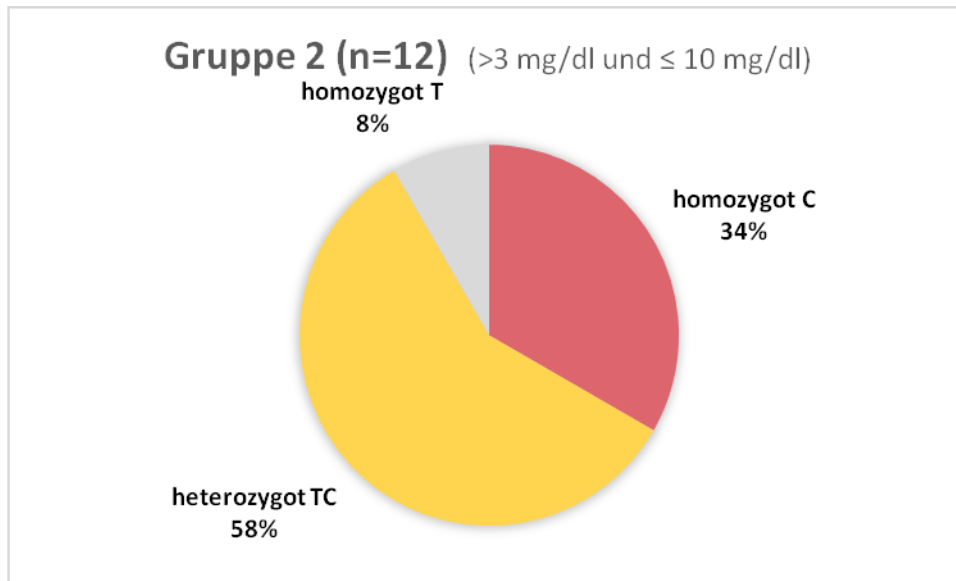
**Gruppe 2**

In die Gruppe mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie fielen zwölf Personen, von denen sechs eine Infektionserkrankung (EBV, Hepatitis A) aufwiesen. Das Geschlechterverhältnis männlich : weiblich war mit 7 : 5 recht ausgeglichen (siehe Tab. 18).

Nr.	M/F	Alter	Grund-erkrankung	V444A Status	Bili ges
22	F	15,8	Cholezystolithiasis	TC	8,75
7	F	16,3	EBV	CC	8,34
37	M	0,3	Intra- und extrahepatische Gallengangshypoplasie	TC	7,96
26	M	14,8	Hepatitis unklarer Genese	CC	7,09
24	M	3,3	Akutes Leberversagen unklarer Genese	CC	7,07
8	F	17,2	EBV	TT	6,58
14	M	14,1	Hepatitis A	TC	6,39
1	M	15,8	ALL	CC	5,90
39	F	17,1	Fettleber mit Transaminasenerhöhung	TC	5,90
5	M	15,0	EBV	TC	5,20
15	F	16,8	Hepatitis A	TC	5,06
29	M	0,1	Alpha1-Antitrypsin-Mangel	TC	4,37
10	F	16,7	EBV	TC	3,11

**Tabelle 18: Übersicht über PatientInnen mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie.** In die Gruppe 2 fielen PatientInnen mit einer Hyperbilirubinämie (>3 mg/dl und ≤ 10 mg/dl).

Nur ein Kind in der Gruppe mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie war homozygot für das Wildtyp-Allel des V444A-Polymorphismus. Jedoch ist die Häufigkeit der genetischen Variante CC in dieser Gruppe mit 31 % bereits deutlich geringer als in der Gruppe mit sehr stark erhöhter Hyperbilirubinämie. Acht der dreizehn Kinder zeigten die heterozygote Ausprägung TC (siehe Abb. 21). Die Häufigkeit des C-Allels in dieser Gruppe beträgt 0,615. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist das statistisch nicht signifikant (siehe Tab. 19).



**Abbildung 21:** Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie.

**Gruppe 2 (n=13)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,8356	0,8435	1

**Tabelle 19: p-Werte für Gruppe 2.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei PatientInnen mit stark erhöhter Hyperbilirubinämie im Vergleich zu Kontrollgruppen.

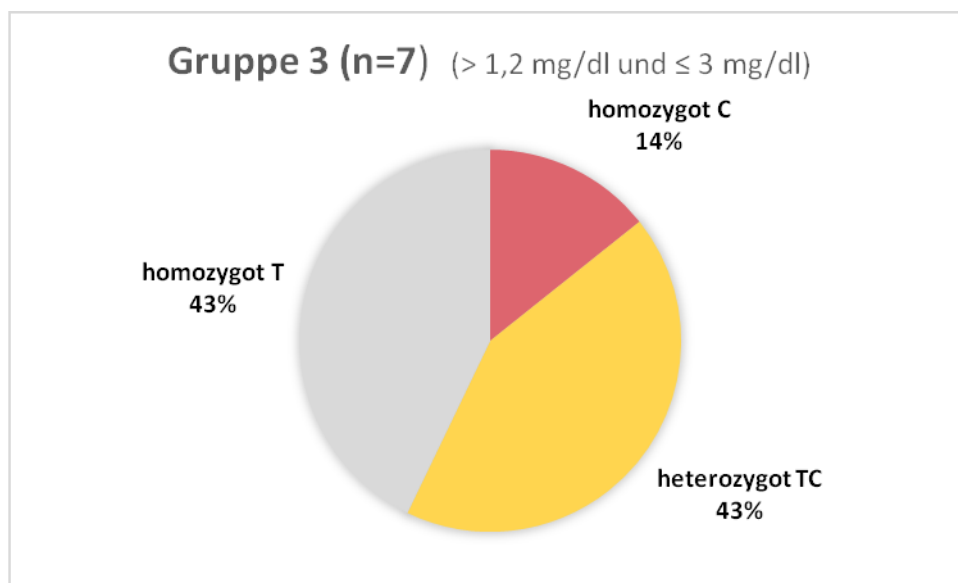
### Gruppe 3

Die Gruppe mit leicht erhöhter Hyperbilirubinämie besteht vor allem aus PatientInnen mit EBV einerseits und aus Kindern mit Cholezystolithiasis andererseits. In die Gruppe fielen fünf Mädchen und zwei Buben.

Nr.	M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges
28	M	14,5	Hepatopathie unklarer Genese	TT	3,00
20	F	14,8	Cholezystolithiasis	TT	2,58
11	M	17,6	EBV	TC	2,19
6	F	13,8	EBV	TC	1,99
16	F	12,8	Cholezystolithiasis	CC	1,86
18	F	13,4	Cholezystolithiasis	TT	1,56
9	F	17,5	EBV	TC	1,37

**Tabelle 20: Übersicht über PatientInnen mit mäßig erhöhter Hyperbilirubinämie.** In die Gruppe 3 fallen PatientInnen mit einer Hyperbilirubinämie ( $> 1,2\text{mg/dl}$  und  $\leq 3\text{ mg/dl}$ ).

In der Gruppe mit leicht erhöhter Hyperbilirubinämie bis  $3\text{ mg/dl}$  verschiebt sich die Relation: Die homozygote Variante ist mit  $14\%$  deutlich seltener, heterozygot TC und Wildtyp TT sind mit  $34\%$  gleich häufig (siehe Abb. 22). Die Veränderung ist statistisch nicht relevant (siehe Tab. 21).



**Abbildung 22: Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit mäßig erhöhter Hyperbilirubinämie.**

### Gruppe 3 (n=7)

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,0464	0,1022	0,09785

**Tabelle 21: p-Werte für Gruppe 3.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei PatientInnen mit mäßiger Hyperbilirubinämie im Vergleich zu Kontrollgruppen.

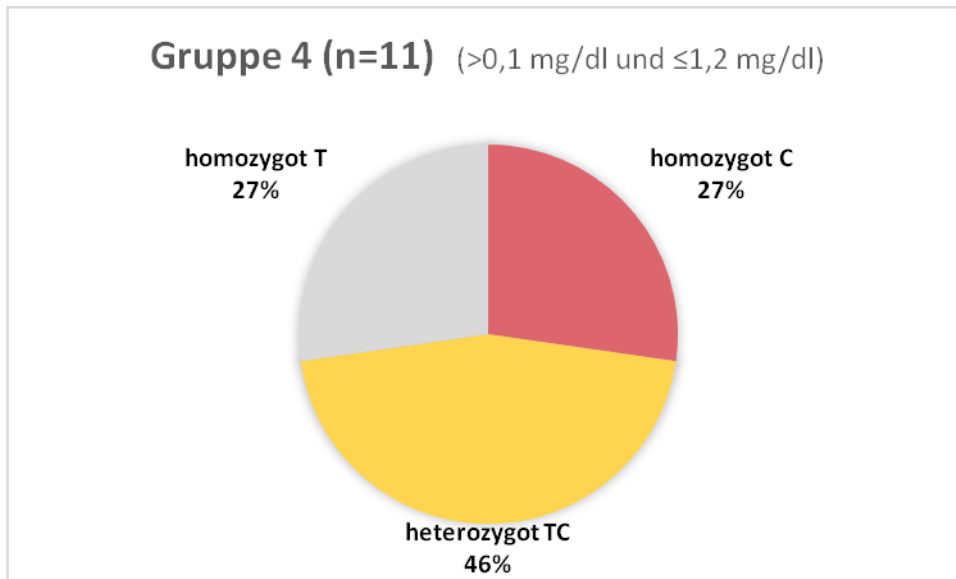
### Gruppe 4

In diese Gruppe ohne Hyperbilirubinämie fallen vor allem Kinder mit unklarer Hepatopathie und PatientInnen mit Gallensteinen. Das Geschlechterverhältnis ist ausgeglichen mit männlich : weiblich = 5 : 6 (siehe Tab. 22).

Nr.	M/F	Alter	Grunderkrankung	V444A Status	Bili ges
36	M	3,7	Leberzirrhose und Gallengangshypoplasie	CC	1,08
12	F	2,8	Varizellen und Scharlach	TC	1,01
27	M	1,4	Hepatopathie unklarer Genese	TT	0,89
3	F	5,0	ALL	TC	0,8
25	F	15,3	Chron. Hepatopathie unklarer Genese	TC	0,73
19	M	15,5	Cholezystolithiasis	CC	0,71
17	F	1,9	Cholezystolithiasis	TT	0,65
30	F	9,8	Dermatomyositis	TC	0,43
38	M	14,2	Milz- und Leberkalzifikationen unklarer Genese	TT	0,40
34	M	9,8	Zystische Fibrose	CC	0,38
13	F	17,8	Scharlach DD Toxic Shock Syndrom	TT	0,27

**Tabelle 22: Übersicht über PatientInnen mit Bilirubinwerten innerhalb des Normbereiches.** In die Gruppe 4 fallen PatientInnen mit normalem Bilirubin (>0,1 mg/dl und ≤1,2 mg/dl).

In dieser Gruppe tritt der V444A-Genpolymorphismus wieder häufiger auf, der Wildtyp kommt zu 27 % vor (siehe Abb. 23). Allerdings fallen in diese Gruppe alle PatientInnen, die nicht aufgrund einer Hyperbilirubinämie, sondern aufgrund anderer leberbezogener Auffälligkeiten auf das Vorliegen des V444A-Polymorphismus gescreent wurden.



**Abbildung 23:** Verteilung der Ausprägung von V444A bei PatientInnen mit normalem Bilirubinspiegel.

**Gruppe 4 (n=11)**

Plattform	HapMap	1000G	EVS
p-Wert	0,2567	0,3951	0,3858

**Tabelle 23: p-Werte für Gruppe 4.** Statistische Auswertung der C-Allelhäufigkeit mittels 2x2 Fisher-Exakt-Test bei PatientInnen mit normalem Bilirubinspiegel im Vergleich zu Kontrollgruppen.

Weiters wurden die Mittelwerte der Bilirubinspiegel der drei genetischen Varianten berechnet. Dabei zeigte sich, dass Kinder mit homozygoter Ausprägung des V444A-Polymorphismus mit 9,84 mg/dl den höchsten Mittelwert hatten, während der Mittelwert bei PatientInnen mit heterozygoter Ausprägung mit 3,51 mg/dl nur etwa ein Drittel davon betrug. Kinder mit dem Wildtyp TT hatten im Mittel einen Bilirubinspiegel von 4,26 mg/dl (siehe Abb. 24).

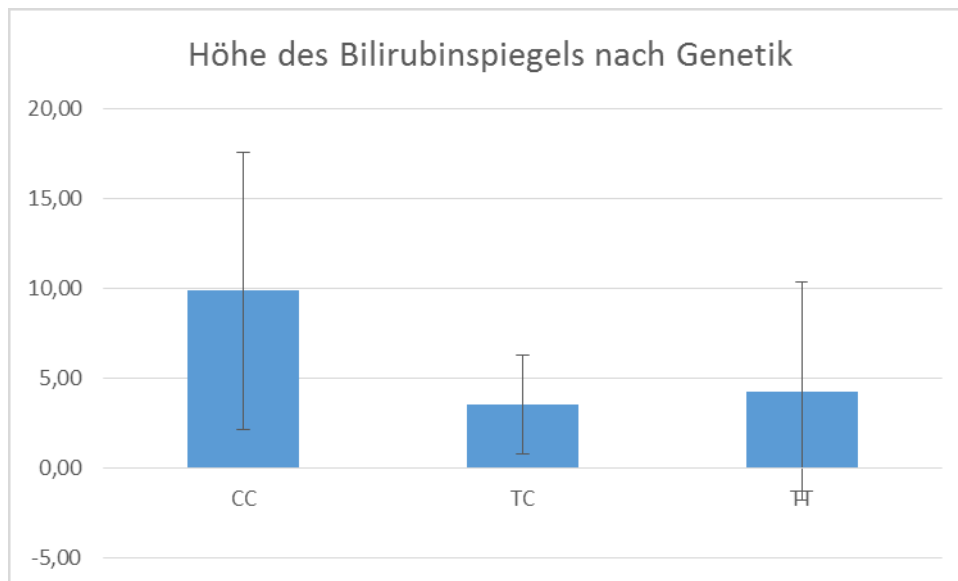


Abbildung 24: Höhe des Gesamtbilirubins in der gesamten Studienpopulation nach Genetik.

### 3.3.2. Korrelation mit weiteren Laborwerten

Ziel der Arbeit war es ebenfalls, die Genotyp-Daten der gescreenten PatientInnen auf zusätzliche Zusammenhänge mit weiteren Laborparametern bzw. Symptomen zu untersuchen. Allerdings war außer einer Korrelation mit Hyperbilirubinämie und dem damit hervorgerufenen Symptom des Ikterus kein Zusammenhang zu erkennen.

Die Transaminasen AST und ALT waren zwar nur bei vier PatientInnen innerhalb des Normbereiches, der Rest hatte leicht bis stark erhöhte Werte, jedoch war keine Korrelation der Höhe der Laborwerte mit dem V444A-Status zu erkennen.

AP wurde nur bei 27 PatientInnen gemessen. Davon waren bei 25 PatientInnen erhöhte Werte zu verzeichnen, aber auch hier war kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Laborwerte und dem homozygoten oder heterozygoten Vorliegen von V444A zu erkennen.

Bei 84 % der PatientInnen war GGT erhöht. Es war wiederum kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Werte und dem V444A-Genpolymorphismus zu erkennen, nachdem die Mittelwerte ohne einen Ausreißer mit sehr stark erhöhtem Wert berechnet wurden.

Von 38 Kindern, von denen Laborwerte für CHE vorlagen, hatten nur vier PatientInnen Werte außerhalb des Normbereichs. Auffallend ist, dass alle vier PatientInnen den V444A-Genpolymorphismus homozygot (CC) ausgeprägt hatten. Gleichzeitig hatten jene Kinder auch eine Hyperbilirubinämie von 5,9 mg/dl oder höher. Vergleicht man die Laborwerte der Genotypen, so ist der Mittelwert bei den homozygoten (CC) Kindern etwas niedriger als bei den heterozygoten (TC) Kindern, jedoch ist der Unterschied nur sehr gering.

Auch LDH war beim Großteil der PatientInnen erhöht, nur sieben PatientInnen hatten Werte innerhalb des Normbereiches, von zwei Kindern lagen keine Werte vor. Zwischen V444A und der Höhe der Werte war keine Korrelation zu entdecken.

Ebenfalls ohne erkennbaren Zusammenhang war der Vergleich des V444A-Status mit Symptomen wie Hepatomegalie oder Pruritus.

## 4. Diskussion

An der Kinderklinik Graz waren wiederholt Fälle zu beobachten, bei denen Kinder transient sehr hohe Bilirubinwerte entwickelten, einerseits bei bekannter Grunderkrankung, andererseits als Erstsymptom mit erst später erfolgter Diagnose einer Erkrankung, bei der Hyperbilirubinämie nicht krankheitstypisch ist. In den meisten Fällen waren die Bilirubinwerte zur Zeit der Grunderkrankung vorübergehend erhöht, nach Ausheilen der Erkrankung gingen auch die Bilirubinwerte ohne Therapie in den Normbereich zurück.

Dem V444A-Polymorphismus, einer genetischen Variante in der GS-Exportpumpe BSEP wird eine Rolle in der Entwicklung einer Schwangerschaftscholestase und von Medikamentös-induziertem Leberschaden zugeschrieben. Träger des Polymorphismus scheinen unter normalen Bedingungen keine Probleme zu haben, werden jedoch auffällig, wenn BSEP durch zusätzliche Faktoren eingeschränkt wird. Dadurch wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus auch bei der Entstehung einer Hyperbilirubinämie im Rahmen einer Entzündung und bei ALL beteiligt sein kann.

Ziel dieser Arbeit war es, retrospektiv zu analysieren, ob die homozygote bzw. heterozygote Ausprägung des V444A-Polymorphismus in dem gescreenten PatientInnenkollektiv häufiger auftritt als in der Normalbevölkerung.

Die Erwartungen bei dieser Studie waren, dass bei Kindern, die an einer Infektiösen Mononukleose erkrankten und im Rahmen ihrer Erkrankung eine Hyperbilirubinämie entwickelten, der V444A-Polymorphismus häufiger auftritt, bzw., dass der V444A-Polymorphismus für die Ausbildung einer Hyperbilirubinämie im Zuge einer Infektiösen Mononukleose prädisponiert. Die gleiche Annahme galt für die Entwicklung einer Hyperbilirubinämie im Rahmen einer ALL.

In die Studie wurden 39 PatientInnen eingeschlossen, wobei die ProbandInnen eine sehr heterogene Gruppe mit einer sehr großen Bandbreite an Erkrankungen

darstellten. Dies führte dazu, dass die PatientInnenzahl pro Krankheitsgruppe sehr klein war, womit keine ausreichende statistische Power gegeben war, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

In der Gruppe der Kinder, die an **Infektiöser Mononukleose** (EBV-Infektion) erkrankt waren, konnten Zusammenhänge zwischen der Genetik und der klinischen Symptomatik angenommen werden. Der Gendefekt konnte bei sieben von acht PatientInnen (87,5 %) nachgewiesen werden, davon waren zwei Kinder homozygot CC und fünf Kinder heterozygot TC. Es zeigte sich, dass jene Kinder mit der homozygoten Ausprägung des Gendefektes auch gleichzeitig die höchsten Bilirubinwerte vorzuweisen hatten (> 8,34 mg/dl). Der Vergleich der Häufigkeit des C-Allels bei dieser Gruppe mit der Normalbevölkerung war statistisch nicht signifikant, was möglicherweise mit der geringen Fallzahl einhergeht.

Ebenso waren Tendenzen anzunehmen bei PatientInnen, die an **ALL** erkrankt waren. In der sehr kleinen PatientInnengruppe von drei Kindern konnte bei allen der Polymorphismus V444A nachgewiesen werden, zweimal homozygot, einmal heterozygot. Auch hier war zu beobachten, dass die PatientInnen mit homozygoter Ausprägung die höchsten Bilirubinwerte zu verzeichnen hatten. Eine statistische Signifikanz bei dem Vergleich der C-Allel-Häufigkeit mit der Normalbevölkerung konnte ebenfalls nicht bewiesen werden. Die Zahl von drei PatientInnen ist dafür zu klein.

Keine Tendenzen in Zusammenhang mit V444A waren bei der **Cholezystolithiasis** zu entdecken. Weder war der Gendefekt in dieser Gruppe besonders häufig, noch konnte ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der V444A-Genetik und der Klinik gestellt werden.

Außerdem wurde bei einer weiteren sehr heterogenen Gruppe von PatientInnen mit **Hepatopathie unklarer Genese** mit oder ohne Hyperbilirubinämie der V444A-Status erhoben. Diese waren durch unterschiedliche Symptome die Leber betreffend klinisch aufgefallen und hinsichtlich des V444A-Polymorphismus

genotypisiert worden. Das C-Allel war in dieser Gruppe im Vergleich zu Kontrollpopulationen nicht häufiger zu finden, jedoch waren bei PatientInnen mit homozygoter Ausprägung CC die Bilirubinwerte im Mittel etwas höher als bei PatientInnen mit heterozygoter Ausprägung TC.

Zehn Kinder mit unterschiedlichen Grunderkrankungen wurden ebenfalls als Gruppe zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet. Es sollte beobachtet werden, ob sich über den Beobachtungszeitraum Häufungen bei gewissen Krankheiten ergeben und ob auch Hyperbilirubinämien, die sich im Rahmen dieser Krankheiten entwickelten, im Zusammenhang mit V444A stehen könnten. Neun der zehn PatientInnen hatten den V444A-Polymorphismus ausgeprägt, es konnte keine statistische Signifikanz beim Vergleich der C-Allelhäufigkeiten mit der Normalbevölkerung hergestellt werden. Zu beobachten war hier wiederum, dass die Bilirubinwerte der homozygoten (CC) im Vergleich zu den heterozygoten im Mittel mehr als vierfach höher waren.

Die verschiedenen Krankheitsgruppen umfassten jeweils sehr wenige Fälle. Bei EBV, ALL und Grunderkrankungen mit transienter Hyperbilirubinämie war zwar keine statistische Signifikanz nachzuweisen, jedoch erscheint es aufgrund der Ergebnisse dieser Pilotstudie sinnvoll, PatientInnen dieser Gruppen weiterhin auf das Vorliegen des Polymorphismus zu screenen um für eine Folgestudie eine höhere Fallzahl und somit ausreichende statistische Power zu erzielen. Ebenfalls ist zu überlegen, ob man die Studie auf eine Multicenter-Studie ausweitet, um ein umfassenderes Spektrum an Fällen einzuschließen.

In dieser Studie wurden nur PatientInnen mit Infektiöser Mononukleose und ALL gescreent, die im Rahmen ihrer Erkrankung eine Hyperbilirubinämie oder einen abnormalen Anstieg der Leberenzyme zeigte. Auf eine Kontrollgruppe wurde aufgrund von vorhandenen Daten über die Häufigkeit des V444A-Polymorphismus in der Literatur verzichtet. Für eine Folgestudie ist zu erwägen, eine Kontrollgruppe aufzustellen mit PatientInnen, die an EBV und ALL erkrankt sind, jedoch keine Hyperbilirubinämie entwickelten. Dabei wäre interessant zu überprüfen, wie häufig der Gendefekt bei EBV-Erkrankten ist, die keine

Hyperbilirubinämie im Laufe ihrer Erkrankung entwickeln, um diese Zahlen in Vergleich setzen zu können mit Erkrankten, die sehr wohl eine Hyperbilirubinämie entwickelt haben. Zusätzlich wäre es interessant zu ermitteln, wie hoch der Prozentsatz an Kindern ist, die V444A zwar homozygot oder heterozygot ausgeprägt haben, aber im Rahmen einer Infektiösen Mononukleose dennoch keine Hyperbilirubinämie ausprägen. Außerdem besteht die Überlegung, eine Studie am Mausmodell durchzuführen. Dabei sollen Mäuse mit hetero- bzw. homozygoter Ausprägung des V444A-Polymorphismus mit EBV infiziert werden und deren GS- und Bilirubinwerte verglichen werden. Es soll beobachtet werden, ob ein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen besteht.

Am deutlichsten zu sehen ist die Korrelation zwischen dem V444A-Polymorphismus und einer Hyperbilirubinämie. Sieben von acht PatientInnen mit sehr stark erhöhten Bilirubinwerten von über 10 mg/dl waren Träger der homozygoten Variante des V444A-Genpolymorphismus, der Unterschied in der Häufigkeit des C-Allels zur Normalbevölkerung war signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch sind in der gesamten Studienpopulation die Mittelwerte der Bilirubinspiegel bei Trägern des homozygoten V444A-Genotyps mehr als doppelt so hoch wie bei Kindern mit heterozygotem Genotyp.

Keine Zusammenhänge waren erkennbar zwischen einem Anstieg der Lebertransaminasen und V444A bzw. den Cholestaseparametern AP und GGT und V444A.

Bilirubin ist jedoch nur ein indirekter Parameter. Bei einer fortführenden Studie wäre es das Ziel, auch eine Analyse der GS zu inkludieren, um BSEP direkt zu evaluieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei einer transienten, unklaren Hyperbilirubinämie sinnvoll ist, den V444A-Status zu erheben. Bisher führte ein Ikterus zu multiplen Abklärungen bis hin zur invasiven Leberbiopsie. Die Kenntnis der V444A-Genetik gibt hier eine Hilfestellung zur Diagnosefindung und legt den Fokus vermehrt auf den „second hit“ als auf die Leber. Außerdem ist die Kenntnis

über das Vorliegen des Polymorphismus wertvoll, da Träger eine größere Wahrscheinlichkeit haben, im Laufe ihres Lebens eine Schwangerschaftscholestase (ICP) oder eine Medikamenten-induzierte Cholestase (DIC) zu entwickeln.

Der Mechanismus, der zur Ausbildung einer Cholestase bei PatientInnen mit dem V444A-Polymorphismus führt, ist noch unklar. Änderungen der Expression von Transportern könnten eine Rolle spielen. Diao et al. [57] zeigten den Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  auf BSEP: Während die Expression der mRNA von BSEP herunterreguliert wurden, war das BSEP-Protein unter IL-1 $\beta$  und IL-6-Therapie erhöht.

### **Conclusio**

Der V444A-Gendefekt kommt signifikant häufiger bei stark erhöhten Bilirubinwerten vor ( $p < 0,05$ ), was zu dem Umkehrschluss führt, dass V444A für die Entwicklung einer Hyperbilirubinämie prädisponiert. Der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen V444A und einer Hyperbilirubinämie im Rahmen einer EBV-Infektion bzw. eines ALL-Schubes wird Ziel weiterer Studien sein.

Die Ermittlung des V444A-Status ist sinnvoll bei PatientInnen, die im Rahmen einer Grunderkrankung eine unklare, transiente Hyperbilirubinämie entwickeln. Dessen Kenntnis hilft bei der Diagnosefindung und beugt unnötigen Abklärungsuntersuchungen vor.

## Literaturverzeichnis

1. Klinker R, Pape HC, Silbernagl S. Physiologie. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2005.
2. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
3. Siegenthaler W, Blum HE. Klinische Pathophysiologie. 9th ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
4. Treyer A, Müsch A. Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*. 2013;3:243–87.
5. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of internal medicine*. 1999;159:2647–58.
6. Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 1999;14:24–29.
7. Monte MJ, Marin, Jose J G, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15:804–16.
8. Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *Journal of hepatology*. 2005;43:342–57.
9. Chiang, John Y L. Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology*. 2013;3:1191–212.

10. Kosters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2008;38:1043–71.
11. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004;126:322–42.
12. Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2006;43 Suppl 1:S10-6.
13. Alissa FT, Jaffe R, Shneider BL. Update on progressive familial intrahepatic cholestasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2008;46:241–52.
14. Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Seminars in liver disease*. 2010;30:125–33.
15. Keitel V, Häussinger D. Neue Erkenntnisse zu Gallesäuretransportern in der Leber - Relevanz für die Klinik? *Hep Net Journal*. 2010;4:10–11.
16. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology*. 2002;123:1649–58.
17. Mwinyi J, Kullak-Ublick GA. Hereditäre Defekte hepatobiliärer Transportproteine. *Der Gastroenterologe*. 2010;5:39–48.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11377-009-0345-8>.
18. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2007;293:C1709-16.

19. Jara P, Hierro L, Martínez-Fernández P, Alvarez-Doforno R, Yáñez F, Diaz MC, et al. Recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation. *The New England journal of medicine*. 2009;361:1359–67.
20. Häussinger D, Kubitz R. Hepatobiliärer Transport und Lebererkrankungen. *Klinische Forschergruppe KFO 217*;2009.
21. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=rs2287622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=rs2287622).
22. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
23. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=rs2287622](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=rs2287622).
24. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2006;44:62–74.
25. Müllenbach R, Weber SN, Krawczyk M, Zimmer V, Sarrazin C, Lammert F, et al. A frequent variant in the human bile salt export pump gene ABCB11 is associated with hepatitis C virus infection, but not liver stiffness in a German population. *BMC gastroenterology*. 2012;12:63.
26. Dixon PH, van Mil, S W C, Chambers J, Strautnieks S, Thompson RJ, Lammert F, et al. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut*. 2009;58:537–44.
27. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, et al. Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2009;49:553–67.
28. Keitel V, Vogt C, Häussinger D, Kubitz R. Combined mutations of canalicular transporter proteins cause severe intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology*. 2006;131:624–29.

29. Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, et al. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331TC polymorphism in the bile salt export pump. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14:38–45.
30. Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, Zodan-Marin T, Jung D, Breymann C, et al. Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics*. 2004;14:91–102.
31. Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007;17:47–60.
32. Kubitz R, Keitel V, Scheuring S, Köhrer K, Häussinger D. Benign recurrent intrahepatic cholestasis associated with mutations of the bile salt export pump. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40:171–75.
33. Brinkmeyer C. Der V444A-Polymorphismus der Gallensalzexportpumpe BSEP ist ein Prädiktor für das Therapieansprechen bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion. Düsseldorf.
34. Blackmore L, Knisely A, Hartley JL, McKay K. Polymorphisms in ABCB11 and ATP8B1 Associated with Development of Severe Intrahepatic Cholestasis in Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013:159–61.
35. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*. 2013;3:1035–78.

36. Levitt DG, Levitt MD. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2014;7:307–28.
37. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19:6398–407.
38. Losa-García JE. Síndrome mononucleósico. *Medicine*. 1998;7:3813–17.
39. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24:193–209.
40. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *American family physician*. 2004;70:1279–87.
41. González Saldaña N, Monroy Colín, Victor Antonio, Piña Ruiz G, Juárez Olguín H. Clinical and laboratory characteristics of infectious mononucleosis by Epstein-Barr virus in Mexican children. *BMC research notes*. 2012;5:361.
42. Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM, Sokol RJ. Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1998;4:469–76.
43. Barlow G, Kilding R, Green ST. Epstein-Barr virus infection mimicking extrahepatic biliary obstruction. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2000;93:316–18.
44. Lawee D. Mild infectious mononucleosis presenting with transient mixed liver disease: case report with a literature review. *Canadian family physician Médecin de famille canadien*. 2007;53:1314–16.

45. Kang M, Kim T, Shim K, Jung S, Cho M, Yoo K, et al. Infectious mononucleosis hepatitis in young adults: two case reports. *The Korean journal of internal medicine*. 2009;24:381–87.
46. Kofteridis DP, Koulentaki M, Valachis A, Christofaki M, Mazokopakis E, Papazoglou G, et al. Epstein Barr virus hepatitis. *European journal of internal medicine*. 2011;22:73–76.
47. Horwitz CA, Burke MD, Grimes P, Tombers J. Hepatic Function in Mononucleosis Induced by Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus. *Clinical Chemistry*. 1980;26(2):243–46.
48. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381:1943–55.
49. Cortes JE, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*. 1995;76:2393–417.
50. Beckingham IJ. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Gallstone disease. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2001;322:91–94.
51. Njeze GE. Gallstones. *Nigerian journal of surgery : official publication of the Nigerian Surgical Research Society*. 2013;19:49–55.
52. Wedderburn LR, Rider LG. Juvenile dermatomyositis: new developments in pathogenesis, assessment and treatment. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 2009;23:665–78.
53. Jayaraman S, Joo NS, Reitz B, Wine JJ, Verkman AS. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:8119–23.

54. Parisi GF, Di Dio G, Franzonello C, Gennaro A, Rotolo N, Lionetti E, et al. Liver disease in cystic fibrosis: an update. *Hepatitis monthly*. 2013;13:e11215.
55. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American journal of hematology*. 2009;84:618–25.
56. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3:16.
57. Diao L, Li N, Brayman TG, Hotz KJ, Lai Y. Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ . *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:31185–92.

## Anhang: Projektplan

Nov 2013	Erstkontakt mit Betreuer
	Themenauswahl
	Beginn der regelmäßigen wöchentlichen Treffen
	Konzeptformularerstellung
	Beginn der PatientInnensuche
Februar 2014	Famulatur an der Kinderklinik Graz
	Beginn der Literatursuche
	Erstellung einer Exceltabelle
April 2014	Ende der PatientInnensuche
	Auswertung der Ergebnisse
Juni 2014	Präsentation der Diplomarbeit im Rahmen der „Mariatroster Forschungsklausurtagung 2014“
Februar-April 2015	Verfassen der Diplomarbeit
Mai-Juli 2015	Korrekturen
Oktober 2015	Abgabe